
22500551355

PRAKTIKUM DER GEWEBEPFLEGE ODER EXPLANTATION BESONDERS DER GEWEBEZÜCHTUNG

VON

DR. PHIL. RHODA ERDMANN
PRIVATDOZENT DER PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT AN DER FRIEDRICH WILHELMS-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

MIT 101 TEXTABBILDUNGEN



VERLAG VON JULIUS SPRINGER · BERLIN
1922

DEM BEGRUNDER
DER ENTWICKLUNGSMECHANIK

WILHELM ROUX

IN DANKBARER ERGEBENHEIT

Vorwort.

Diese Einführung in die Methodik der Gewebepflege ist der erste Versuch, diese Methode in weitere Kreise zu verbreiten. Schon auf der Universität soll der werdende biologische Forscher sie kennen lernen, damit er später bei Inangriffnahme eigener Arbeiten frei über sie verfügt. Nach fast zweijährigem Kursbetrieb hat sich in mir die Überzeugung entwickelt, daß eine Einführung in die Gewebepflege im Universitätsunterrichtsbetrieb nötig und möglich ist. Mit sehr einfachen Mitteln und auf elementare Art habe ich Gewebepflege erfolgreich lehren können. Bis jetzt wurde die Methode in Forschungs-Instituten von Person zu Person gelehrt, und dabei stand eine reiche Apparatur und viel Assistenz zur Verfügung. Das hinderte früher und auch jetzt vielfach die Ausbreitung dieser so wichtigen Methode. Der Forscher braucht natürlich mehr Assistenz, reichere Apparatur, bessere Einrichtungen als ich sie hier aufgezählt habe. Aber, was mir so wichtig erscheint, daß diese Methode ein Gemeingut derer wird, die in Zukunft biologisch forschend arbeiten wollen, kann, wie man hier sieht, auf verhältnismäßig einfache Weise, mit billigen Mitteln erreicht werden.

Zwar steckt die Methode der „Gewebepflege im Explantat" noch in den Kinderschuhen. Sie wird aber in Zukunft bestimmt sein, gleichberechtigt neben die anderen Methoden der kausalanalytischen Forschung zu treten, wenn viele Köpfe und viele Hände an ihrer Vervollkommnung arbeiten. Es ist erst ein Anfang dazu gemacht.

Wie notwendig ein so allgemeines Kennenlernen der Methodik ist, beweist die Geschichte des Wissenszweiges, nämlich der Entwicklungsmechanik (Entwicklungsphysiologie), aus welcher die Gewebepflege, und enger die Gewebezüchtung hervorgegangen ist. Die Entwicklungsmechanik, populär auch experimentelle Entwicklungslehre genannt, umfaßt eine Reihe von Disziplinen, die manches in der Methodik gemeinsam haben, aber sich doch in der speziellen Fragestellung und in der Art ihrer Lösung unterscheiden. Wir sprechen z. B. von Transplantations- und Explantationsmethoden in der kausalanalytischen Forschung. Sie beide haben als Material lebende Organismen, Organe, Organteile, Gewebe und Zellen, mit denen experimentiert wird. Bei ihnen ist das Schicksal des Explantates oder des Transplantates die Hauptsache und nicht auch das des Organismus, aus welchem sie entnommen sind, wie es bei Regenerationsexperimenten der Fall ist. Die Explantation hat schon eine lange Geschichte hinter sich und zeigt, daß jeder neue Wissenszweig sich seine Methodik schafft. Diese Methode wurde 1884 von W. Roux (Gesamm. Abhandl. II, S. 247) erdacht, indem er mit Hilfe von Herausschneidung

der Medullarplatte des Hühnchens und Beobachtung der weiteren Entwicklung in einer warmen Kochsalzlösung kausalanalytisch ermittelte, daß der Schluß des Medullarrohres nicht nach HIS durch den Druck der wachsenden Nachbarteile der Medullarplatte, sondern durch Selbstschluß dieser Platte erfolgt. Dies war das erste kausalanalytische Experiment, in dem ROUX zur Lösung eines bestimmt gestellten morphologischen Problems diese Methode anwandte. Es folgte von demselben Forscher 1893 (II, S. 986—995; Arch. f. Entwickl.-Mech. I u. III) die Isolation von Furchungszellen des Frosches im Hühnereiweiß oder in einer ½ proz. Kochsalzlösung. Hierbei wurde die gegenseitige Näherung der Zellen (Zytotropismus), die flächenhafte Vereinigung zu geschlossenen Komplexen, die nachträgliche Umordnung und das Wiederaustreten von Zellen aus dem Verbande im analytischen Experiment beobachtet; kurz, alle Erscheinungen der Zytotaxis, deren weitere Erforschung jetzt ein großes Gebiet in der Gewebepflege einnimmt.

In den letzten 20 Jahren, seit den Arbeiten von HARRISON, BURROWS, CARREL u. a. hat die Explantation von Geweben sich hoch entwickelt. Wenn auch HARRISON seine Experimente aus entwicklungsmechanischen Gründen angestellt hat, so sind jetzt wieder viele Arbeiten erschienen, die die Methode der Gewebepflege anwenden und doch nur rein deskriptiv arbeiten. Das liegt natürlich daran, daß erst die wichtige Frage nach der Art eines analysierbaren Nährmediums restlos gelöst werden sollte. Diese Lösung fehlt noch. Aber ist sie erst erreicht, so wird auch die Methode der Explantation, besonders der Gewebeexplantation für die kausalanalytische Forschung von hochbedeutendem Nutzen sein, wie ja auch erst durch die Transplantation nach dem Erscheinen von BORNS, BARFURTHS, BRAUS', HARRISONS, MORGANS, DRIESCHS, HERBSTS u. a. Arbeiten und den Arbeiten ihrer Schüler eine Renaissance der Zoologie aufging, nachdem nach ROUX' Vorgang bewußt kausalanalytisch zu experimentieren begonnen worden war.

So muß auch mehr und mehr die Zellenlehre aus einer deskriptiven Wissenschaft eine experimentelle und allmählich auch kausalanalytische werden. Deshalb ist die Methode der Gewebezüchtung zu pflegen; um die Erhaltungs- und Gestaltungsfunktionen der lebenden Zelle und des lebenden Gewebes unter verschieden experimentell gesetzten Umständen auszulösen und qualitativ zu beeinflussen.

Berlin-Wilmersdorf, Juni 1922.

RHODA ERDMANN.

Inhaltsverzeichnis.

Umgrenzung des Arbeitsgebietes.

Zum Beginn soll der Begriff „Explantation", der 1905 von W. ROUX geprägt wurde, oder Gewebepflege im Explantat kurz definiert werden, damit die gestellte Aufgabe abgegrenzt werden kann. Gewebepflege zerfällt in: die Pflege des Ganzexplantates-Totalexplantates und die Pflege des Teilexplantates-Partialexplantates.

Im Ganzexplantat wird verschiedenes Material gepflegt, mitunter auch gezüchtet. Die Ganzexplantation beschäftigt sich mit der Pflege des ganzen oder fast des ganzen Organismus, die Teilexplantation mit der von Organen, Organteilen, Geweben, Zellen, die, von dem Mutterorganismus entfernt, in ein nichtlebendes Kulturmedium zu kurzer oder länger dauernder Lebenderhaltung eingeführt werden.

Die Ganzexplantate werden wir in diesen Übungen nicht behandeln. Die Auspflanzung des zentralen Teiles von Hühnerkeimen, die durch ROUX 1884 ausgeführt, von Hühnerkeimen durch WORTHER und WHIPPLE 1912, von ganzen Keimblasen des Kaninchens durch BRACHET 1913, sowie die Erhaltung des zu früh geborenen menschlichen Kindes gehören zur Ganzexplantation. Zu dem Ganzexplantat aus dem Muttertier oder aus dem Ei steht im Gegensatz das Teilexplantat, das aus dem Organismus genommen ist (OPPEL, 1914, S. 93). Die Pflege der Ganzexplantate unterscheidet sich aber nicht prinzipiell von der, welche wir den Teilexplantaten widmen. Der Zusammenhang zwischen dem Organismus und dem ihm entnommenen Teile ist bei dem Teilexplantat enger, infolgedessen ist die Gewebepflege schwieriger. Gewebepflege im Teilexplantat wollen wir kurz einfach „Gewebezüchtung" nennen, wenn wir uns bewußt bleiben, daß nicht alle Gewebepflege Gewebezüchtung ist, denn Züchtung bedeutet Vermehrung. Nicht jedes gepflegte Teilexplantat vermehrt sich. Es finden Ab- und Umbauerscheinungen in ihm statt, die von großer Wichtigkeit sind, aber doch hinter der Gewebezüchtung im strengen Sinne an Bedeutung zurücktreten, bei der ein quantitatives Wachstum der Zellelemente unter mitotischen Erscheinungen Voraussetzung ist.

Noch ein Wort zur Stellung der Explantation zur Transplantation. Bei der Transplantation ist das Wichtige, daß das transplantierte Gewebestück mit einem anderen, lebenden Organismus verbunden wird, während wir bei der Explantation das explantierte Gewebestück mit einem nicht lebenden Kulturmedium umgeben. Die Transplantation von Hautstückchen, Gelenken, Sehnenbändern aus dem Geber in den Geber selbst wieder nennen wir „autoplastische Transplantation". Die Transplantation aus dem Geber in einen speziesgleichen

Empfänger nennen wir „homoioplastische Transplantation", die Transplantation von dem Geber in einen speziesfremden Empfänger nennen wir „heteroplastische Transplantation". Wir werden manche Erfahrungen, die bei der Transplantation im Laufe des letzten Vierteljahrhunderts gemacht worden sind, zum Vergleiche mit den Ergebnissen, die wir bei der Explantation, also unserer eigentlichen Aufgabe, erzielen, heranziehen.

Ich habe noch hinzuzufügen, daß die Transplantationen jetzt, nach dem Erfolg, in „Implantation" und „Interplantation" zerfallen. Werden die Gewebestücke dauernd erhalten und kann das Gewebestück seine Gewebefunktion ausüben, so sprechen wir mit Roux von Implantation (Beispiel: funktionierendes Kniegelenk, Lexer). Wenn das Transplantat das aber bei der Übertragung gelebt haben muß, während der Transplantation nur vorübergehend als Brücke oder Leitung dient und später durch körper-eigenes Gewebe wenigstens in dieser Form ersetzt wird, sprechen wir mit Oppel von Interplantation oder funktioneller Substitution (Haut bei Säugetieren).

Bei der Explantation war das Überraschende, daß Teile eine Zeitlang fortleben, nachdem sie von dem Organismus, zu dem sie zuvor gehörten, abgetrennt waren (Oppel, 1914, S. 9). Dies Verfahren hat man anfangs auch nach Nebenumständen der Technik „in-vitro-Kultur", „Deckglaskultur", später nach den Forschern, welche die Methode sehr verbessert und ihr allgemeinere Anwendbarkeit verschafft haben, „Harrison-Carrelsche Kultur" genannt.

Mir ist es nicht lieb, wenn der Ausdruck „Kultur" ohne weiteres gebraucht wird. Der Begriff „Kultur" hat eine so eng umgrenzte Definition in der Bakteriologie erhalten, daß es nur zu Begriffsverwechslungen führt, wenn wir von „in-vitro-Kultur" sprechen. „Kultur" im Sinne der Bakteriologen bedeutet, daß die eingepflanzten Bakterien jahrelang weitergezüchtet werden können, sich also in der Kultur vermehren und aus derselben Kultur überimpfen lassen. Wenden wir diese Begriffe an für die Explantation, so folgt daraus, daß wir Gewebe in ein Medium pflanzen, dann, nachdem es gewachsen ist, Teile des neuentstandenen Gewebes in ein neues Medium bringen, wiederholt Teile von diesem neuen Gewebe umpflanzen und dies ad infinitum fortsetzen. Von dem eingepflanzten Stück darf keine Zelle erhalten bleiben. Dies ist bis jetzt nur ein einziges Mal von Carrel und seinem Mitarbeiter Ebeling erreicht worden, welche den größten Erfolg mit dem Verfahren erzielt haben. Jüngst ist auch Fischer 1922 dasselbe für embryonales Epithelgewebe gelungen.

Carrel hatte embryonales Gewebe aus einem 8 Tage alten Hühnerembryo in Blutplasma und Embryonalextrakt gezüchtet und alle 3—5 Tage dieses Medium erneuert, nachdem das Stückchen, welches er eingepflanzt hatte, in Ringerscher Lösung gewaschen worden war. Durch den ständigen Wechsel des Mediums, den Carrel selbst ungefähr zwei Jahre lang durchführte, gab er dem Gewebe den für dasselbe nötigen Nährstoff, und durch das Waschen entfernte er die Abbaustoffe. Sein Mitarbeiter Ebeling setzte dies fort, und ihm ist es möglich gewesen, von derselben Ausgangskultur Zellen zu züchten, die noch heute, nach

neun Jahren, leben. Ich betone noch einmal, dies war mesenchymales, also embryonales Gewebe, das sich, wie bekannt, durch eine große Wachstumstendenz auszeichnet. Dieses Experiment ist noch nicht wiederholt worden. Erst jetzt, im Jahre 1922 ist es gelungen, Epithelzellen drei Monate lang zu züchten, und zwar hat Fischer nach vielen Versuchen durch einen glücklichen Zufall ein wenig Irisepithel, das noch an der Linse sitzt, rein züchten können. So ist nicht nur die embryonale Mesenchymzelle, sondern auch die embryonale Epithelzelle bis jetzt während längerer Zeiträume züchtbar. Dies ist also eine wirkliche Kultur.

Es ist eine unglückliche Angewohnheit der Forscher, die bis jetzt auf dem Gebiete der Gewebezüchtung gearbeitet haben, von neuen Generationen zu sprechen, jedesmal, wenn sie das Gewebestück in ein neues Medium setzen. Man sollte von einer Zahl von Generationen nur sprechen, wenn man zahlenmäßig feststellen kann, wie oft die Ausgangszelle, welche mit dem Gewebestück in das Plasmamedium gesetzt wurde, sich geteilt hat. Das ist bis jetzt noch nicht einwandfrei geschehen, und wir wollen lieber sagen: wir können Abkömmlinge der explantierten Zellen, z. B. durch 300 maligen Nährmediumwechsel, jahrelang in vitro erhalten. Es bleibt also eine noch unerfüllte Aufgabe, die Zahl der sich bildenden Zellgenerationen im Explantat festzustellen.

Aber wir würden die Aufgabe der Gewebezüchtung zu eng fassen, wenn wir uns nur darauf beschränkten, Zellen in das Nährmedium zu verpflanzen, von denen wir annehmen, daß sie sich periodisch teilen können, sondern wir müssen auch alle jene Gewebe des erwachsenen Körpers in den Kreis unserer Betrachtungen ziehen, die erst aus einem Latenzzustand erweckt werden müssen, die von den Zellprodukten, wie Bindegewebsfibrillen, Muskelfibrillen, befreit werden müssen, um dann unter Umständen sich wieder neu zu teilen. Während also die eine Seite der Gewebepflege sich mit embryonalen und vielleicht mit Geschwulstzellen befaßt, beschäftigt sich die Gewebepflege weiter mit dem Abbau und den Veränderungen, die die erwachsene Zelle im Zuchtmedium erleidet. Wir dürfen hier aber nicht den Ausdruck „überlebend“ anwenden, weil, wenn auch diese Zelle überlebend erscheint, sie doch wirklich lebend ist. Das Nervengewebe im erwachsenen Körper z. B. teilt sich für gewöhnlich auch nicht, nur unter bestimmten Bedingungen kommt es bei der Regeneration zur Teilung, und doch sagen wir nicht daß das Gehirn in unserem Körper überlebend ist, sondern es ist lebend. Die Grenzen sind natürlich sehr verwischt und schwer feststellbar.

Die erste Gruppe von Erscheinungen spielt sich in den ausgewanderten oder in den neugewachsenen Zellen ab. Die zweite Gruppe geht auch in dem Gewebekomplex, welchen wir in das Plasmamedium tun, selbst vor. Bis jetzt hat man sich meistens mit den auswandernden und sich neubildenden Zellen beschäftigt. Erst in den letzten Jahren hat man auch die anderen Phänomene in den Kreis der Betrachtungen gezogen, wie z. B. den Abbau der Muskel- und Bindegewebe und elastischen Fasern. Wir werden uns zuerst mit folgender Gruppe von Erscheinungen befassen, und zwar werden wir aus didaktischen Gründen die Ver-

änderungen des erwachsenen Kaltblütlerepithels, dann Lebensäußerungen der Zellen, weiter das Verhalten des embryonalen Binde-, Muskel-, Epithel- und Nervengewebes der Warmblütler während der Züchtung betrachten, um dann zu den Erscheinungen an dem erwachsenen Gewebe überzugehen. Es ist wichtig, genau jede Zellart zu studieren,



Abb. 1 zeigt das zur Plasmaentnahme und zum Ansetzen der Kulturen notwendige Instrumentarium.

damit später, wenn man aus verschiedenen Zellarten zusammengesetzte Gewebe betrachtet, schon Normen gefunden sind, wie sich z. B. die Bindegewebszelle, die Epithelzelle im Plasmamedium verhalten. Nach diesen vorbereitenden Bemerkungen, die unsere Aufgabe begrenzt haben, nehmen wir die Züchtung der Froschhaut vor, nachdem wir das dazu nötige Instrumentarium und die dazu nötigen Lösungen vorbereitet haben.

Aufzählung und Beschreibung der notwendigen Apparate.

Der Operationsraum soll eine Zentrifuge mit nicht zu geringer Umdrehungszahl, ungefähr 2—3000 Umdrehungen in der Minute — also keine Handzentrifuge —, einen Thermostaten, der auf 38° C gestellt und womöglich elektrisch geheizt wird, einen Eisschrank und einen praktischen Operationstisch enthalten. Das Arbeitszimmer muß außer der in den Laboratorien gebräuchlichen Einrichtungen einen kleinen Trockensterilisator haben. Das Institut bedarf eines Autoklaven, und wenn das nicht möglich, eines Dampftopfes. Der Kurs selbst erfordert für 4—6 Teilnehmer an Glasinstrumenten:

- 6 große Glasschalen, Durchmesser etwa 23 cm, Höhe etwa 8 cm (je 3 davon werden bei jeder Operation gebraucht),
- 24 Drigalski-Schalen,
- 48 Petri-Schalen,
- 3 kleine Schalen mit eingeschliffenem Deckel,
- 12 dickwandige Zentrifugengläser,
- 12 dickwandige Reagenzgläser,

12 dickwandige Reagenzgläser (Länge etwa 10 cm, Durchmesser etwa 7 mm für kleine Tiere; Länge etwa 10 cm, Durchmesser etwa 13—14 mm für größere Tiere),

100 Stück hohlgeschliffene Objektträger (Durchmesser 20 mm, Tiefe 1,5 mm),

runde oder eckige Deckgläser, die die Öffnung des Objektträgers bedecken (22 mm Durchmesser, Dicke 0,20—0,22 mm) — (es werden auch Micascheiben empfohlen, sie sind gut zu benutzen, wenn man das wachsende Gewebe nicht mit starken Vergrößerungen beobachten will).

6 Plasmaentnahmepipetten (nach ERDMANN, Abb. 2a),

6 Tropfenpipetten (nach ERDMANN, Abb. 2b),

LUERsche Spritzen, 3 zu 2 ccm, 3 zu 3 oder 4 ccm, mit nicht zu engen Kanülen.



Abb. 2. a) Plasmaentnahmepipetten. b) Tropfenpipetten zum Ansetzen der Kulturen.

Alle Glassachen sind vor Gebrauch tagelang zu wässern und in Wasser zu halten. Beim Reinigen soll jede Säure vermieden werden, nur durch Wässern, Kochen und Reinigen mit Gänsefedern werden die Glasgefäße saubergehalten. Falls die Gefäße nicht gebraucht werden, sind sie in häufig zu wechselndem Leitungswasser aufzubewahren.

Besonders wichtig ist das Reinigen der Deckgläschen. Man hält sich für diesen Zweck ein kleines Porzellantiegelchen bereit, das aber zu nichts anderem benutzt werden soll. Darin kocht man die neuen Deckgläschen in reinem Wasser auf und gibt ganz zuletzt einen Schuß Alkohol hinzu, um alle etwa vorhandenen fettigen Bestandteile zu lösen. Man läßt dann die Deckgläschen im Wasser soweit abkühlen, daß man sie anfassen kann, und poliert dann vorsichtig — da die Gläschen sehr dünn sind und leicht zerbrechen — jedes einzelne Deckgläschen, bis es ganz trocken und blank ist. Das Tuch, welches man zum Putzen nimmt, muß gesäumt und von glatter Leinwand sein, damit keine Fusselchen auf den Deckgläsern bleiben. Zuletzt poliert man jedes einzelne Deckgläschen mit japanischem Seidenpapier nach; dieses haltbare, nicht fasernde Seidenpapier ist in den Geschäften für medizinische Bedarfsartikel zu kaufen.

Auch das Reinigen der Kanülen erfordert Sorgfalt; sie müssen vor und nach Gebrauch ausgekocht und getrocknet werden; es darf sich kein Rost bilden.

An Metallinstrumenten sind außer den für jede kleine Tieroperation üblichen, noch besondere Scheren, Pinzetten oder Klammern erforderlich, die für jede Operation, je nach der Tiergattung, verschieden sind und später noch beschrieben werden.

Für das Ansetzen der Gewebekulturen sind für jeden Praktikanten unbedingt nötig:

1 kleine auseinandernehmbare Schere,
2 Nadeln, ganz aus Metall,
2 kleine Lanzetten, ganz aus Metall,
1 sehr kleine Pinzette ohne Rillen mit stumpfen Enden (6—8 cm lang),
1 KÜHNsche Pinzette.

Die Deckgläser stellt und reinigt jeder Praktikant selbst.

Sämtliche Glasinstrumente sind von der Firma „Labag", Laboratoriums-Ausrüstungsgesellschaft, Gebrüder Muencke & Klönne & Müller, Berlin NW 40, Platz vor dem Neuen Tor 1a (Einzelverkauf: Luisenstraße 49), zu beziehen.

I. Veränderung der Zellformen in verschiedenen Medien.

Die zuerst zu lösende Aufgabe ist die Züchtung der Haut des erwachsenen Frosches in verschiedenen Medien, um die Veränderungen der Zellform in ihrer Abhängigkeit von der Konsistenz des Mediums kennen zu lernen. Die Froschhaut soll in folgenden Medien gezüchtet werden:

a) in Froschplasma, in Hühnerplasma;
b) in Ringerlösung, in Augenkammerwasser und verschiedenen Kombinationen dieser Medien.

In drei verschiedene, zeitlich getrennte Aufgaben zerfällt unsere Arbeit. Wir haben:

A. Die Kulturmedien zu gewinnen;
B. Die Kulturen anzulegen und zu pflegen;
C. Die Kulturen zu beobachten und die auftretenden Erscheinungen zu deuten.

Alle Arbeiten sind gleich wichtig.

Aus didaktischen Gründen empfiehlt es sich, mit der Züchtung von Kaltblütlergeweben zu beginnen, weil die Hände des Praktikanten sich erst einarbeiten müssen und weil bei Kaltblütlern die Plasmagewinnung leichter ist als bei Warmblütlern. Trotzdem der Frosch sich seiner Kleinheit wegen nicht empfiehlt, ist es nicht zu vermeiden, die einheimischen Froschspezies zu verarbeiten, da Frösche von allen Wirbeltieren am billigsten sind.

A. Gewinnen der Kulturmedien.

Die Bereitung des Froschplasmas macht zuerst Schwierigkeiten, weil das Blut steril aus dem relativ kleinen Herzen eines einheimischen Frosches entnommen werden muß. Eine Stunde vor der Operation

werden die Zentrifugenröhrchen, die Röhrchen für das gewonnene Plasma und die Pipetten zur Plasmaentnahme mit Paraffin ausgekleidet. Man verfährt auf folgende Weise:

Drei große Schalen (s. Abb. 1) werden sterilisiert und 5 Tücher, ungefähr 45—50 cm im Quadrat, die aus kräftigen, nicht fasernden Stoffen verfertigt sein müssen. Es ist nötig, daß diese Tücher gesäumt und absolut heil sind, damit keine Fasern stören. Hat man einen Dampfsterilisator, so ist es richtig und vorgeschrieben, die Tücher in ihm zu sterilisieren und die Schalen in einem Trockensterilisator. Hat man keinen Dampfsterilisator zur Verfügung, so sterilisiert man die Tücher vorsichtig im Trockensterilisator. Man läßt die Schale etwas abkühlen und nimmt sie halb warm heraus und stellt sie auf den Tisch, auf dem man seine Vorbereitungen treffen will. Das zur Auskleidung benutzte Paraffin, 42—46° Schmelzpunkt, muß am Tage vorher filtriert werden und zwar stets in Gefäßen, die nur für diese Arbeit bestimmt sind. Ehe diese Gefäße in Gebrauch genommen waren, sind sie in Wasser ausgekocht und einen Tag in fließendem Wasser gehalten worden. Das Vaselin, dunkelgelbes sog. amerikanisches, das zur Auskleidung der Spritzen bei der Blutentnahme gebraucht wird, muß auch vorher filtriert werden und fraktioniert sterilisiert worden sein. Es ist praktisch, sich vielleicht 2 Pfund im Autoklaven sterilisiertes Vaselin in größeren Glasgefäßen fertig zum Gebrauch hinzustellen, und dann kleinere, auch vorher sterilisierte Gefäße für den jeweiligen Gebrauch zurechtzumachen. Wir brauchen das Vaselin nur, wenn wir die jetzt zu beschreibende Methode der Blutentnahme anwenden. Sollten wir das Blut mit Hilfe eines Glashebers direkt in die Zentrifugenröhrchen spritzen, wie es bei manchen Tieren möglich ist, so fällt für diesen ersten Teil der Mediumgewinnung der Gebrauch des Vaselins ganz fort (s. S. 15, Abb. 8).

Vorher genau austarierte Zentrifugenröhrchen	4—6 Stück,
kleine Reagenzröhrchen	6—8 ,,
Plasmaentnahmepipetten	4—6 ,,

werden in das halbflüssige Paraffin gelegt, nachdem sie vorher nach Vorschrift vorbereitet worden sind (s. S. 5). Man läßt sie ein paarmal aufkochen und schwenkt sie mit einer ausgeglühten Pinzette oder einer großen Schere im Paraffin. Es ist dringend zu raten, nicht von der Arbeit fortzulaufen, da bei der leichten Entzündlichkeit der Paraffingase schnell eine Entzündung eintreten kann. Falls ein Abzug vorhanden ist, wird natürlich nur zu raten sein, unter diesem beim Paraffinieren zu arbeiten. Während des Erhitzens hat man auf einer erhöhten Rolle ein steriles Tuch aus der Schale ausgebreitet, das als Widerlager der ausgekleideten Röhrchen dient. Haben die Röhrchen tüchtig aufgekocht, so nimmt man zuerst, nachdem man jedes einzelne nochmals in Paraffin tüchtig umgeschwenkt hat, die Zentrifugenröhrchen einzeln heraus und legt sie zum Ablaufen auf das Widerlager. Am bequemsten ist es, wenn man die Flamme mit dem kochenden Paraffin und das Widerlager auf demselben Tische hat. Nachdem nun die Zentri-

fugenröhrchen gut mit Paraffin ausgekleidet sind, werden sie noch warm in das vorbereitete Tuch gepackt. Die Tücher sind in Form von Taschen eingeschlagen, so daß die Zentrifugenröhrchen in die Tasche eingelegt werden können (Abb. 3). Es ist darauf zu achten, daß die Röhrchen nicht aneinander stoßen, weil sie dann, sowie das Paraffin erkaltet, aneinander kleben. Die Röhrchen werden dann zusammen eingeschlagen, das Tuch mit einer Stecknadel zusammengesteckt und hierauf das Tuch in einer sterilen Schale sofort auf Eis gestellt. Der gleiche Vorgang wiederholt sich nun für die Reagenzröhrchen und für die Pipetten. Es ist darauf zu achten, daß die Pipetten nicht verstopft sind. Es ist gut, sie beim Auskleiden zuerst mit der Spitze nach unten zu kehren und sie dann umzudrehen, so daß von den Spitzen aus das überschüssige Paraffin abläuft. Auch sie werden auf das Widerlager, das nach jeder einzelnen

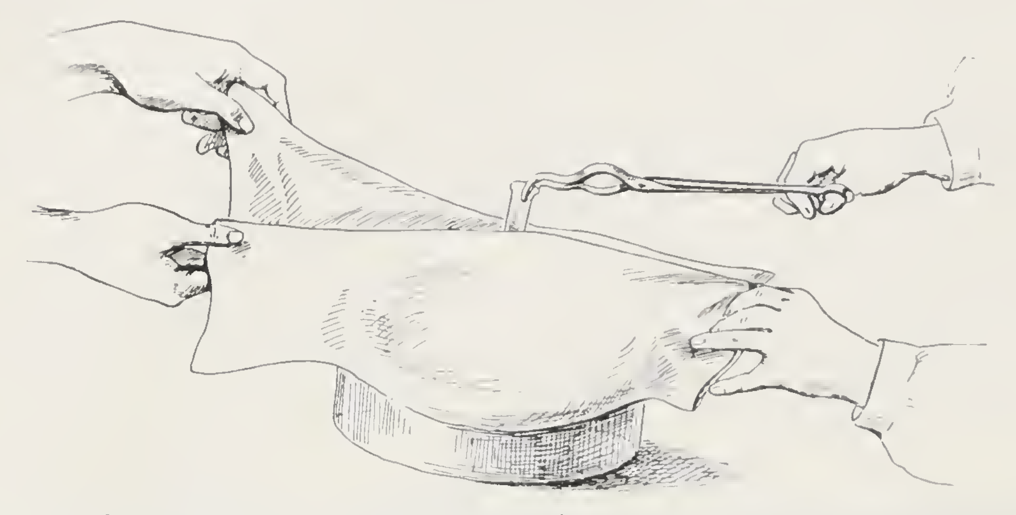


Abb. 3. Tasche, in welche die mit Paraffin ausgekleideten Zentrifugenröhrchen hineingeschoben werden. Siehe Text S. 8.

Operation, also Auskleiden der Zentrifugenröhrchen, der Plasmaaufnahmreöhrchen und der Pipetten, mit einem neuen, sterilen Tuch bedeckt wird, zum Ablaufen gelegt und dann schnell, in ein Tuch eingepackt, auf Eis gestellt. Dazu passende, ausgekochte Gummihütchen werden aufgepaßt und bereit gestellt. Sie sollen frei von Wasser sein.

Noch wichtiger als das Auskleiden der Glasinstrumente ist das Ausvaselinieren der Luerschen Spritze. Dieses stellt an die Kunstfertigkeit der Praktikanten einige Ansprüche. Das Vaselin ist, wie üblich, verflüssigt worden. Während dieser Zeit hat man die Luersche Spritze in Sodawasser ausgekocht, nachdem man die zu brauchenden Kanülen ausgeprobt hat. Man prüft jede Kanüle auf ihre Schärfe und Glätte und reibt sie unter Umständen mit Schmirgelpapier ab oder schleift sie auf einem Schleifstein mit Rillen.

Für jede Tierart sind besondere Kanülen erforderlich. Alle sollen ein ziemlich weites Lumen haben, da das Vaselin sonst die Öffnungen verstopft. Für den Frosch werden kleine, kurze Kanülen gebraucht, für das Huhn etwas feinere, längere, sehr spitze Kanülen, für das Meerschweinchen etwas dickere, ein wenig abgestumpfte Kanülen, für die Ratte die gleichen Kanülen wie für den Frosch. Man hat auch Spritzen

mit auswechselbarem Konus, doch lassen sich diese nicht so gut auskleiden und reinigen. Es ist gut, mehrere Spritzen auszuvaselinieren, so daß man bei der Blutentnahme öfter eine neue, eisgekühlte Spritze gebrauchen kann.

Die Abbildungen 4—7 zeigen die nacheinander folgenden Stadien der Blutentnahme beim Frosch, Rana esculenta.

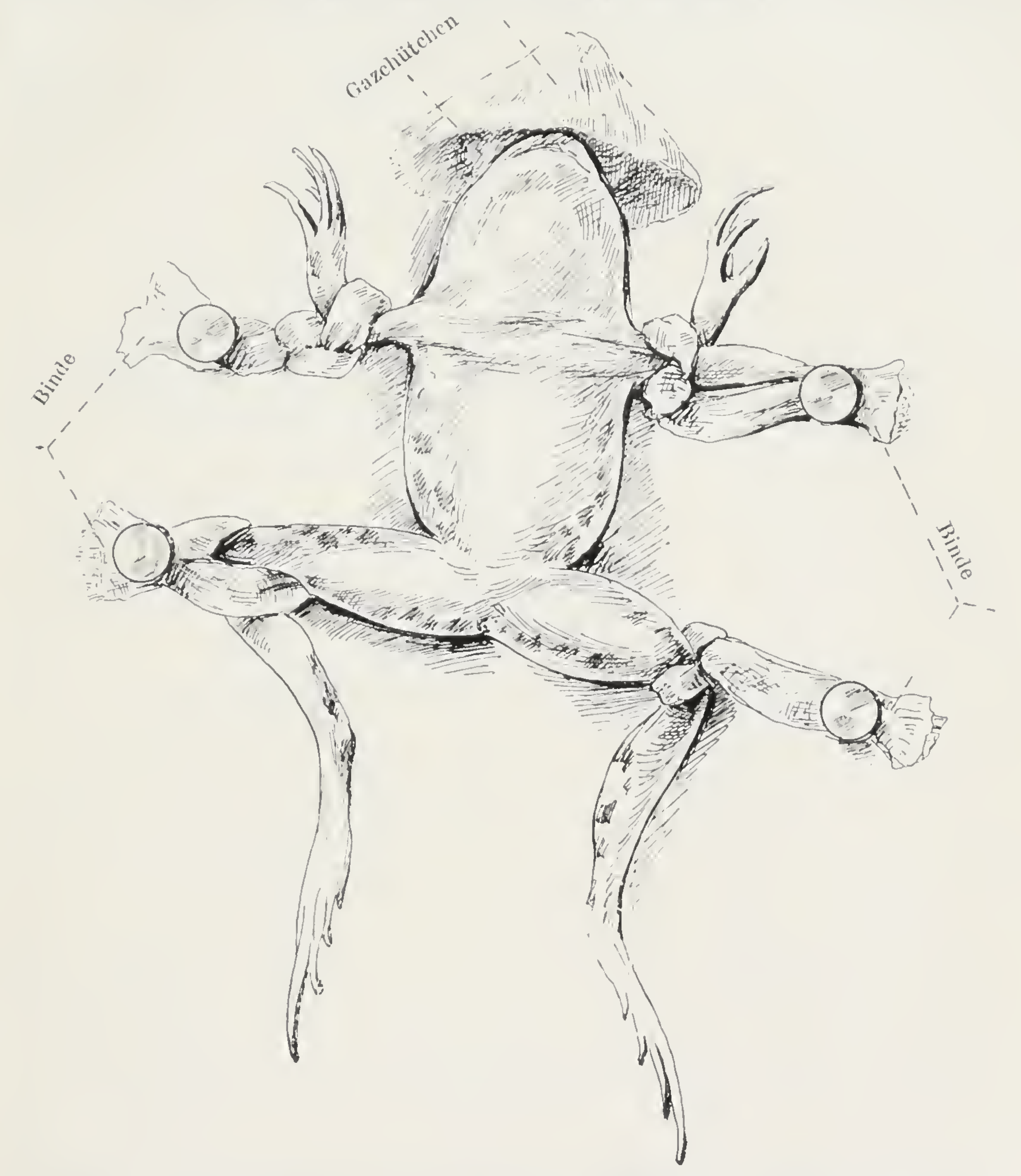


Abb. 4. Der zur Narkose vorbereitete Frosch ist festgebunden. Original, siehe Text.

Die Spritzen werden mit Vaselin ausgekleidet, das man, wie schon früher beschrieben ist, gefiltert und im Autoklaven sterilisiert hat. Während der Zeit, die zum Auflösen des Vaselins, das auf einer Schüssel mit Sand geschieht, gebraucht wird, sind, wie gesagt, die Spritzen in Sodawasser mitsamt den Kanülen, die vorher aufgepaßt und auf ihre Durchlässigkeit probiert worden sind, ausgekocht. Man spritzt das anhaftende und in der Spritze sitzende Wasser gut und gründlich

aus, ohne aber die Spritze zu sehr abkühlen zu lassen. Man zieht nun ein wenig des flüssigen Vaselins in die Spritze ein und läßt es wieder zurückfließen und tut dasselbe ein paarmal hintereinander, um alles Wasser aus der Spritze zu entfernen. Das mit Sodawasser vermischte Vaselin läßt man nicht das erste Mal beim Ausspritzen wieder in das Vaselingefäß fließen. Sodann zieht man wieder ein Teil Vaselin in der Spritze hoch, hält nun die Spritze mit der Kanüle nach oben gerichtet und zieht den Stempel langsam zurück; das Vaselin läuft auf diese Weise durch die ganze Spritze. Man drückt nun den Stempel leise nach oben, indem man ihn hin- und herdreht, so daß ringsum an den Innenseiten der Spritze alle Stellen mit Vaselin dünn bedeckt sind. Zuletzt spritzt man das Vaselin zurück in das Gefäß und zieht noch einmal ein klein wenig frisches heißes Vaselin in die Spritze, mit dem man besonders die Kanüle auskleidet, was schnell geschehen muß, damit das Vaselin heiß und flüssig beim Hochziehen bleibt, sonst verstopft sich die Kanüle sehr leicht. Ist alles gut ausgekleidet, so läßt man den Stempel ein wenig zurücksinken, soweit er von selbst gleitet, und legt die so zurechtgemachte Spritze in einer sterilen Schale auf Eis. Die Lücke, die durch das Zurückziehen des Stempels entstanden ist, läßt einen Luftraum zwischen Kanüle und Stempel bestehen, der das Zusammenkleben verhindert, außerdem hat man beim Ingebrauchnehmen der Spritze diese Luftschicht, die ja steril ist, um sie durch die Kanüle zu stoßen, ehe man in das Herz einsticht. Es passiert dann nicht, daß man das Herz infolge der verschlossenen Kanüle zersticht und das strömende Blut nicht in die Spritze bekommt. In die Schale, die zum Aufbewahren der ausgekleideten Kanülen dient, lege man besser ein steriles Tuch, das man faltet, um die Spritzen zu stützen. Die Spritzen liegen darauf ruhiger als auf dem glatten Glasboden.

Für die Plasmagewinnung selbst wählt man zur Operation möglichst große Tiere und läßt sie sich vom Händler frisch gefangen bringen, denn Tiere, die lange im Zimmer und ohne Nahrung gehalten worden sind, haben für die Plasmagewinnung zu wenig Blut.

Der Frosch wird vor der Operation gut abgeseift und unter fließendem Wasser ordentlich abgespült. Man spannt ihn dann auf einem Kork- oder Holzbrett auf (Abb. 4, siehe S. 9). Um zu vermeiden, daß unnütz Blut fließt, soll man auch nicht, wie üblich, die Beine mit Nadeln anstecken, sondern sie werden mit Verbandstoffstreifen festgebunden und diese erst angesteckt auf dem Brett. Die Hinterbeine werden einzeln oder zusammengebunden befestigt, die Enden der Binde schneidet man kurz hinter dem Knoten ab und nagelt dieses Ende mit einer Kopierzwecke gut fest. Die Beine darf man nicht zu locker zusammenbinden, sonst macht sich der Frosch aus der Bandage frei, wiederum darf nicht zu fest angezogen werden, da man dann das Blut staut. Die Vorderbeinchen umbindet man, ein jedes für sich, ebenfalls mit schmalen Binden und steckt sie ausgebreitet links und rechts fest auf das Brett an. Auf diese Weise hat der Frosch eine gute Lage für die Operation: auf dem Rücken, Hinterbeine zusammengebunden, Vorderbeine ausgebreitet aufgesteckt. Wenn man dieses Aufspannen geschickt macht, liegt das Tier meist

sehr ruhig, daß es nur einer sehr schwachen Narkose beim Einschneiden bedarf. Dies ist für die spätere Züchtung von Wert; starke Chloroformnarkose hemmt das Wachstum des Gewebes, das später in das gewonnene Plasma eingepflanzt wird.

Man bedarf beim Frosch nur wenig Instrumente beim Operieren: 2—3 Pinzetten, 1—2 größere zum Festhalten der Haut beim Einschneiden, 1 kleinere mit stumpfen Enden, die zum Festhalten oder besser als Widerstand für das Herz dienen soll, 2—3 PÉANsche Klammern, 2 Knopfscheren (eine größere für die äußere Haut, eine kleinere zum Öffnen der Körperhöhle).



Abb. 5. Der narkotisierte Frosch zeigt die Freilegung der ventralen Muskulatur. Original, siehe Text.

Die Glasinstrumente müssen vor der Operation wenigstens $^1/_2$ Stunde auf Eis gekühlt worden sein. Während die Metallinstrumente kochen, füllt man ein größeres und 3—4 kleine Gefäße — etwa Wassergläser — mit gehacktem Eis und stellt sie bis zum Gebrauch wieder auf das Eis zurück.

Bevor man mit der Operation beginnt, muß der Frosch eine leichte Narkose bekommen, die nur, wie schon erwähnt, so schwach sein soll, daß der Frosch das Einschneiden nicht fühlt und still liegt; ganz kurz vor dem eigentlichen Öffnen der Leibeshöhle soll man die Narkose beginnen. Einige Operateure narkotisieren überhaupt nicht. Man öffnet

dann dem Frosch das Maul und sperrt es durch einen eingeschobenen Keil weit auf, die starke Atemtätigkeit hört dann auf und das Tier liegt so still, daß man ohne Narkose operieren kann. Sobald das Tier ganz ruhig liegt, hebt man mit einer Pinzette die Bauchhaut hoch, schneidet mit dem spitzen Ende der Knopfschere einen kurzen Schnitt ein und öffnet dann die äußere Haut der Körperhöhle durch einen Mittelschnitt,



Abb. 6 zeigt die Öffnung der Körperhöhle, besonders ist auf die Form des Einschnittes zu achten. Original, siehe Text.

indem man das stumpfe Ende der Schere nach unten hält, um kein Gewebe zu verletzen. Man sucht dann an den Hautlappen Stellen, an denen man diese senkrecht einschneiden kann, ohne größere Gefäße zu verletzen. Diese kleinen, seitwärts hängenden Hautlappen klemmt man mit je einer Péanschen Klammer rechts und links fest, um die Fläche für das Einschneiden in die Körperhöhle freizubekommen. (Abb. 5.) Nachdem man das Operationsfeld mit steriler physiologischer Kochsalzlösung, die entsprechend dem Kaltblütlerblute nur 0,7% NaCl enthält, zur Reinigung übergossen hat, schneidet man in den Brustkorb ein. Mit

einer Pinzette hebt man vorsichtig das Sternum auf und sticht stumpf mit der kleineren Knopfschere behutsam ein, schneidet darauf stumpf links und rechts vom Sternum die Rippen ein und klemmt diesen Deckel nach dem Kopfende hin mit einer PÉANschen Klammer fest. Man sieht nun das Herz im Perikard vor sich liegen. (Abb. 6.) Es sind bei der Plasmagewinnung zwei Personen nötig, eine, die das Tier narkotisiert und die gekühlten Gefäße heranholt, und die andere, die in das Herz einzustechen und das gewonnene Blut schnell zu zentrifugieren hat. Sobald also das Herz freiliegt — es ist unnötig und zeitraubend, beim Frosch den Herzbeutel zu öffnen —, sticht man mit der eisgekühlten Spritze (Abb. 7) ein und zieht schnell möglichst viel Blut aus dem schlagenden Herzen auf. Inzwischen muß die zweite Person die Zentrifugenröhrchen vom Eis herbeiholen, steril mit Stopfen verschließen und sie, im Augenblick, wenn das Blut hineingespritzt wird, in das größere Gefäß bringen, das eine aus geklopftem Eis und Seesalz eben hergestellte Kältemischung enthält. Es darf in jedes Zentrifugenröhrchen nur soviel Blut eingefüllt werden, daß alles Blut in der Kältemischung steht. Nun wird schnell zentrifugiert, erst $^3/_4$ Minute, dann 1 Minute, indem man zwischendurch die Röhrchen in neu bereitete Kältemischung in kleinere Gläser zum erneuten Kühlen stellt. Hat man eine Zentrifuge, in der die Zentrifugenröhrchen direkt in Eis zentrifugiert werden können, so ist das Unterbrechen beim Zen-



Abb. 7 zeigt die Lage des Herzens, zur Blutentnahme bereit. Die stumpfe Pinzette hebt das Herz ein wenig empor und gibt dadurch der Kanüle einen Widerstand. Original, siehe Text.

trifugieren nicht nötig. Jede weitere Blutmenge, die noch nach dem zuerst gewonnenen, aus dem wieder voll geschlagenen Herzen aufgezogen wird, muß wieder in die Kältemischung gestellt werden, so lange, bis sie zentrifugiert werden kann. Das Plasma setzt sich als helle Flüssigkeit über dem Blut in den Zentrifugenröhrchen ab und wird mit ebenfalls eisgekühlten Pipetten (siehe Abb. 2a S. 5) abgesaugt und in die ebenso vorbereiteten Plasmaaufnahmeröhrchen gebracht. Diese verwahrt man zuletzt in einem Wasserglas, das ein wenig Kältemischung enthält, versieht dieses Glas mit Namen, Datum usw. und hält das Ganze bis zum Verbrauch im Eisschrank. Alle nötigen Handgriffe, auch das Öffnen des Tieres, müssen schnell und sicher geschehen, es darf kein Augenblick vergeudet, kein Handgriff unnütz gemacht, beim Operieren kein Blut unnütz vergossen werden. Alle notwendigen Gegenstände sollen einwandfrei vorbereitet und im rechten Augenblick zur Hand sein. Man probiere auch kurz vor Beginn der Operation die Zentrifuge aus, damit sie nicht im rechten Augenblick versagt, auch soll man für die Pipetten, die man zum Absaugen des Plasmas benutzt, gut passende, ausgekochte Gummihütchen zurechtlegen und diese nur für diesen einen Zweck verwahren. Solange das Herz noch pulsiert und sich wieder mit Blut füllt, kann man auch versuchen, Blut aufzusaugen, jedoch ist das beim ersten Einstechen gewonnene das beste für die Plasmagewinnung; das später gewonnene Blut gerinnt oft in der Zentrifuge. Daß das, was man beim Abpipettieren gewinnt, auch wirklich Plasma ist, zeigt die flüssig zurückbleibende Substanz, sobald geronnener Blutkuchen im Zentrifugenröhrchen zurückbleibt, hat man nicht Plasma, sondern Serum gewonnen.

Die für die erste Übung außer dem Froschplasma bereit gestellten Medien und Waschflüssigkeiten sind: Augenkammerwasser, Kaltblütler-Ringer, physiologische Kochsalzlösung für Kaltblütler, und evtl. Lösung 753, eine kolloidale Ringerlösung nach Liesegang an Stelle der Ringer-Lösung oder Locke-Lewis-Lösung für Kaltblütler.

Die Gewinnung des Augenkammerwassers. Der Frosch wird, genau so, als ob man ihn zur Operation vorbereitet, ordentlich abgeseift und mit fließendem Wasser abgespült. Das Augenkammerwasser wird mit einer vorher ausgekochten Spritze entnommen, die eine sehr feine Kanüle haben muß. Ein kleines, steriles Gläschen zum Aufbewahren des gewonnenen Materials stellt man sich auf dem Arbeitstische bereit. Man sticht in das Auge schnell und leicht ein, am besten etwas seitlich in die Augenkammer, und zieht im gleichen Augenblick, in dem man die Kanüle einsticht, die Spritze auf. Durch das Platzen der feinen Augenhaut spritzt das Kammerwasser in einem feinen Strahl hoch auf, und nur durch sehr schnelles Aufziehen gelingt es, diesen mit der Spritze aufzufangen. Man spritzt das gewonnene Material in das bereitstehende Gläschen, das nicht mit Paraffin ausgekleidet sein darf, und muß in den meisten Fällen auch aus dem anderen Auge das Kammerwasser gewinnen, weil es sonst zu wenig für das Ansetzen einer größeren Anzahl



Abb. 8. Rana pipiens. Totalpräparat von Rana pipiens zum Verdeutlichen der Blutentnahme vermittels einer Kanüle nach UHLENHUTH, 1919. Arch. für Entw. Bd. 45. Das Blut wird aus dem linken Truncus arteriosus mit der Pipette entnommen, die Pipette in dem linken Truncus, die rechte kleine Klemme auf dem Bilde sperrt den distalen Stumpf des linken Truncus ab, die linke Klemme sperrt den rechten Truncus ab.

von Kulturen ist. Die gebrauchten Frösche setzt man wieder in den Behälter zurück, da nach einiger Zeit sich das Kammerwasser erneuert.

Locke-Lewis-Lösung für Kaltblütler.

$NaCl$ 0,7
KCl 0,042
$CaCl_2$ 0,025
$NaHCO_3$ 0,02
Dextrose 0,25
Aqua dest. 90,0

Ringersche Lösung für Kaltblütler.

$NaCl$ 0,7
KCl 0,025
$CaCl_2$ 0,3
Aqua dest. 100,0

Physiologische Kochsalzlösung für Kaltblütler.

$NaCl$ 0,7
Aqua dest. 100,0

Alle diese Lösungen sind vor Gebrauch zu filtrieren und im Dampftopf zu sterilisieren.

Es hat sich weiter bei Kaltblütlermaterial noch eine kolloidale Ringerlösung, „Lösung 753" nach Liesegang, gut bewährt, besonders zum Auswaschen der Gewebe. Die Zusammensetzung dieser Lösung ist von den Merzwerken, Frankfurt a. M., nicht bekannt gegeben worden, man kann sie nur von dort fertig beziehen. Sie wird in kleineren und größeren Ampullen gebrauchsfertig von den Merzwerken geliefert.

Natürlich ist die eben geschilderte Methode der Plasmaentnahme nicht die einzige, die geübt wird. Es gibt viele andere. So nimmt Uhlenhuth eine paraffinierte Kanüle und sticht sie in den rechten Vorhof von Rana ein, nachdem die zuführenden Gefäße abgeklemmt sind (Abb. 8). Uhlenhuth nimmt eine gerade angespitzte Glaspipette, Thomson eine gebogene. Jeder hat für sein bestimmtes Objekt die Wege zu finden, die ihn zum Ziele führen.

B. Ansetzen der Kulturen.

Sind alle Medien und Lösungen vorbereitet, so kann man mit dem Ansetzen der Kulturen beginnen. Die Glasgefäße, welche man für das Ansetzen gebraucht, sind am besten kurz vor Gebrauch im Trockensterilisator zu sterilisieren, man sterilisiert $^1/_2$ Stunde und läßt vor dem Beschicken mit Nährmedien und Gewebestücken die Glassachen wieder abkühlen. Es sind folgende Glassachen nötig

Hohlgeschliffene Objektträger, die in Drigalskischalen eingelegt werden, in jede Schale etwa 4—7 Stück, je nach der Größe; eine Anzahl Petrischalen; eine Anzahl kleinere Doppelschalen; eine verschlossene Hülse mit Pipetten zur Entnahme und zum Auftropfen der Nährmedien. Diese Pipetten sind (siehe Abb. 2 b, S. 5) für diesen Zweck allein zu gebrauchen und dürfen nie mit Farben oder Säuren in Berührung kommen. Man läßt sie passend für die Plasmaröhrchen zurechtblasen, so daß die

Kapillare der Pipette bis auf den Boden des Plasmaröhrchens reicht und man jeden Tropfen des manchmal spärlichen Materials aufpipettieren kann.

Außerdem braucht man noch Deckgläser in genügender Menge, die man in einer kleinen Doppelschale sterilisiert, nachdem sie, wie vorher schon beschrieben worden ist, sehr peinlich gereinigt und geputzt sind.

Das Ansetzen der Kulturen sollte an einem Tisch geschehen, der nur für diesen Zweck verwendet wird. In einem Laboratorium, in dem dies nicht möglich ist, muß man dann den Tisch, auf dem man arbeiten will, abräumen, reinigen und mit sauberem Papier bedecken, es dürfen keine Farben, Säuren oder verunreinigte Kulturen usw. in der Nähe oder auf dem Arbeitstische selbst bleiben. Man stellt sich die oben aufgeführten Glassachen auf dem Tisch zurecht (Abb. 1 S. 4), außerdem auf einer Flamme (die möglichst mit Sparbrenner versehen sein soll) ein Sandbad mit einem kleinen Vaselingefäß, eine Vaselinpipette, eine KÜHNsche Pinzette, die allein von allen Instrumenten, welche zum Ansetzen der Kulturen Verwendung finden, ausgeglüht werden darf, da sie nicht mit den Gewebestückchen in Berührung kommt. Alle anderen Instrumente werden ausgekocht und zugedeckt auf den Tisch gestellt. An Instrumenten braucht man:

1—2 kleine Scheren, die auseinander genommen werden können, zum Zerschneiden der Gewebestücke; 1—2 Lanzetten und einige Nadeln und eine feine Pinzette zum Zerzupfen der Gewebestückchen. Das Material, von dem man Kulturen ansetzen will, und das Nährmedium bleibt, bis man es zur Arbeit braucht, auf Eis. Das Vaselin wird aufgelöst und dann über der klein gestellten Flamme stehengelassen. Die sterilisierten Glassachen und die Hülse mit Pipetten stellt man ebenfalls auf dem Tische, an dem man arbeitet, zurecht. Von dem abgeseiften und mit Ringer abgespülten Frosch schneiden wir ein Stück Rückenhaut scharf heraus. Die Rückenhaut ist geeigneter, da die Bauchhaut durch den Reichtum an Bindegewebe zu lederartig ist.

Die Gewebestücke, die man zur Gewebekultur verwendet, verwahrt man in einem sterilen Schälchen, evtl. in RINGERscher Lösung, wie die Froschhaut auf. Nachdem die Gewebe aus dem lebenden Tierkörper entnommen sind, bringt man sie schnell auf Eis, damit die Funktionen des lebenden Gewebes bis zum Einsetzen in das Kulturmedium unterbrochen werden und erst durch den Aufenthalt in dem Kulturmedien wieder in Funktion treten. Das Auswaschen der Gewebe in RINGERscher Lösung vor dem Einbringen in das Medium geschieht, damit diese vollkommen steril in das Medium gelangen und vielleicht anhaftende Blutkörperchen entfernt werden.

Nachdem man die Vorarbeiten beendet hat und alle nötigen Dinge handlich bereit gestellt hat, beginnt man mit dem Einsetzen der Gewebe, wobei man bei jeder Art von Geweben streng alle aseptischen Regeln beachten und beim Warmblütlermaterial besonders schnell arbeiten muß, um die Funktion der Gewebe nicht zu lange zu unterbrechen. Bei Kaltblütlern, die später ja in Zimmertemperatur wachsen,

ist diese Regel insoweit wichtig, als durch schnelles Arbeiten größere Möglichkeiten gegeben sind, steril zu arbeiten. Die Gewebe, von denen jede Art einen besonderen Modus der Entnahme und Vorbehandlung erfordert, werden also mit Ringerscher Lösung ausgewaschen und mit sterilen Instrumenten zu sehr kleinen Stückchen zerschnitten. Von diesen kleinsten Stückchen bringt man die betreffenden, die man zur Gewebekultur verwenden will, nochmals in Ringersche Lösung. Die Deckgläser breitet man mit einer ausgeglühten Kühnschen Pinzette in Petrischalen aus, wobei man die Schale so wenig wie möglich öffnet. So viele Deckgläser legt man in eine Petrischale, wie man in der dazu gehörigen Drigalskischale Objektträger ausgebreitet hat. Auf diese Deckgläschen bringt man die ausgewaschenen, in frischer Ringerlösung liegenden Gewebestückchen, die nun so schnell wie möglich mit dem Nährmedium beschickt werden müssen. Niemals dürfen die Gewebestückchen trocken werden. Wenn Plasma als Nährmedium verwendet wird, muß man sorgen, daß es bis zu diesem Augenblicke, in dem man es braucht, aufgetaut ist. Es muß daher, wenn man mit dem Kulturenansetzen beginnt, aus der Kältemischung herausgenommen und in einem trockenen Gefäß auf den Arbeitstisch gestellt werden. Genügt dies noch nicht, um das Plasma aufzutauen, so hält man es am besten eine Zeitlang in der warmen Hand. Bei Verwendung von anorganisch bereiteten Nährmedien ist dies nicht nötig, weil diese flüssig sind und gleich verwendet werden können. Für jedes Nährmedium — falls man sich bei einem Male Kulturen ansetzen verschiedener bedient — hat man eine neue Pipette zu verwenden. Man darf nie mit derselben Pipette von einem Nährmedium ins andere hineingehen. Die Pipetten sollen gutsitzende ausgekochte Gummihütchen haben, damit sie — besonders bei Plasma — geringe Mengen von Nährmedium noch aufsaugen können. Die Stückchen sind jetzt also auf dem Deckglas, und ein jedes ist mit einem Tropfen Nährlösung beschickt. Alle Handgriffe haben dabei so zu geschehen, daß die Petrischale möglichst wenig geöffnet wird; beim Hochheben des Deckels verfährt man am besten so, daß die Seite, die dem Arbeitenden zugekehrt ist, bedeckt bleibt und der Atem die Kulturen nicht treffen kann. Die Schale wird, wenn alle Stückchen mit Plasma oder anderem Medium beschickt sind, zugedeckt auf die Seite gestellt, und man versieht jetzt die Objektträger, die man zum Auflegen der fertigen Deckgläschen verwendet, mit Vaselinringen. Mit einer nicht zu feinen Pipette umgibt man die Vertiefung der Objektträger mit einem Rande von heißem Vaselin, das nicht so flüssig sein darf, daß es breit in die Vertiefung des Objektringes ausläuft. Es muß rings um die Vertiefung einen festen, schmalen Wall bilden, der die Deckgläser und damit die Kulturen gegen die Außenluft abschließt und dadurch das Austrocknen der Gewebe verhütet. Die Deckgläser mit dem im Nährmedium liegenden Material faßt man mit der ausgeglühten Kühnschen Pinzette an, so daß der Tropfen sich oben befindet, man drückt die Schnäbel der Pinzette fest zu und kehrt die Hand schnell um und setzt das Deckgläschen mit dem jetzt in der Mitte als spitzer Tropfen nach unten hängenden Material auf den Vaselinrand des Objekt-

trägers. Das Gewebestück hängt nun in der Höhlung des Objektträgers, nach oben durch das Deckglas und ringsum durch den Vaselinrand gegen das Austrocknen und Eindringen von Luftverunreinigungen geschützt. Zuletzt sieht man alle fertiggestellten Kulturplatten nochmals nach, drückt noch einmal fest an den Vaselinrand an oder bessert ihn, wo es nötig erscheint, noch aus. Bei Warmblütlermaterial verfährt man dabei so, daß man jede fertige Platte auf einige Augenblicke in den Thermostaten stellt, schon, um die Gewebe nicht so lange der Außentemperatur auszusetzen, und dann auch, weil sich in dem wieder weichergewordenen Vaselinrande die Deckgläser besser festdrücken und dieser sich besser nachfüllen läßt. Sehr häufig ist versucht worden, die Methode des hängenden Tropfens insoweit umzuändern, daß man in Röhrchen oder in größere Kammern, die luftdicht mit Vaselin verschlossen werden, Gewebestücke zur Züchtung bringt. Dieses Verfahren ist dann zu empfehlen, wenn man das wachsende Gewebe nicht unter dem Mikroskop mit starken Vergrößerungen beobachten will und wenn man Wert darauf legt, so große Stücke wie möglich zu züchten. Dem Umfang der Stücke ist eine Grenze gesetzt, die nach der Gewebeart variiert. Lockeres Gewebe, wie Drüsengewebe, in dessen Spalten das Nährmedium leicht eindringen kann, kann in größeren Stücken gezüchtet werden, wie z. B. das sehr dichte Gewebe der Herzklappe. Für spätere Implantations- oder Immunisations-Experimente kann man kleinere Röhrchen oder kleinere Kammern, in die man mehrere Stücke nebeneinander pflanzen kann, benutzen. Es lassen sich aber bei einiger Übung ca. 200 Kulturen in 2 Stunden auch nach der Deckglas-Methode anlegen.

Alle Pipetten, die gebraucht worden sind, müssen sofort in Gefäße mit kaltem Wasser gestellt werden, da das Plasma sonst an den Innenwänden festhängt und man dieses nur sehr schwer losbekommen würde. Man soll alle Gefäße, die bei dem Ansetzen der Kulturen verwendet werden, nach Gebrauch stets in kaltem Wasser verwahren. Zum Reinigen werden sie in reinem Wasser kalt angesetzt und zum Kochen gebracht, soweit es dünne Glassachen sind, die stärkeren Schalen wäscht man heiß aus. Kein Gefäß, das zur Züchtung von Kulturen benutzt wird, darf nebenher zu anderen Zwecken genommen werden. Farben und Säuren müssen streng davon fern gehalten werden. Nur von absoluter Sauberkeit, strenger Trennung der Züchtungsgefäße von anderen, guter Haltung der Metallinstrumente, die bei noch feineren Arbeiten von Mikroglasinstrumenten ersetzt werden (Spemann in Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, „Mikro-chirurgische Operationstechnik“, Bd. V, Teil 3, Heft 1, S. 15—17), und beim Ansetzen der Kulturen vom schnellen, sauberen Arbeiten hängt ein beträchtlicher Teil des Erfolges ab.

C. Beobachten und Pflegen der Kulturen.

Ehe wir an unsere eigentliche Aufgabe herantreten, züchten wir zuerst einige Stückchen Froschhaut in Froschplasma und Augen-

kammerwasser allein (1. Übung), um die vielen Einzelheiten des Ansetzens der Kulturen uns ganz zu eigen zu machen, um Schnelligkeit später schon erworben zu haben und um fähig zu sein, bei dem ersten ausgedehnten Experiment die von jedem Praktikanten begangenen individuellen Fehler auszumerzen. Auch ist soviel erst am lebenden Objekt ganz am Beginn der Züchtung zu beobachten und das Einsehen in das lebende Objekt zu üben, da ja leider das gefärbte Material fast nur in Schnitten bei der heutigen Generation als Studiumobjekt gedient hat. Ich nehme die Protozoologen aus. Dieser Fehler der verflossenen Periode, in welcher die mikroskopische Anatomie vorherrschte, bereitet zuerst viel Mühe, bis die Schwierigkeiten überwunden und das Beobachten der feinsten Lichtbrechungsunterschiede der Kultur und lebenden Zelle durch die Lupe, besser das Binokular und das Mikroskop, wirklich gelingt. Für die spätere Pflege der experimentellen Biologie ist auch dieser Gewinn nicht gering anzuschlagen. Die nach den eben geschilderten Vorschriften vorbereiteten Stückchen Froschhaut schwimmen jetzt mit der früheren Außenseite der Haut nach oben, dem Deckgläschen zu, in dem hängenden Tropfen.

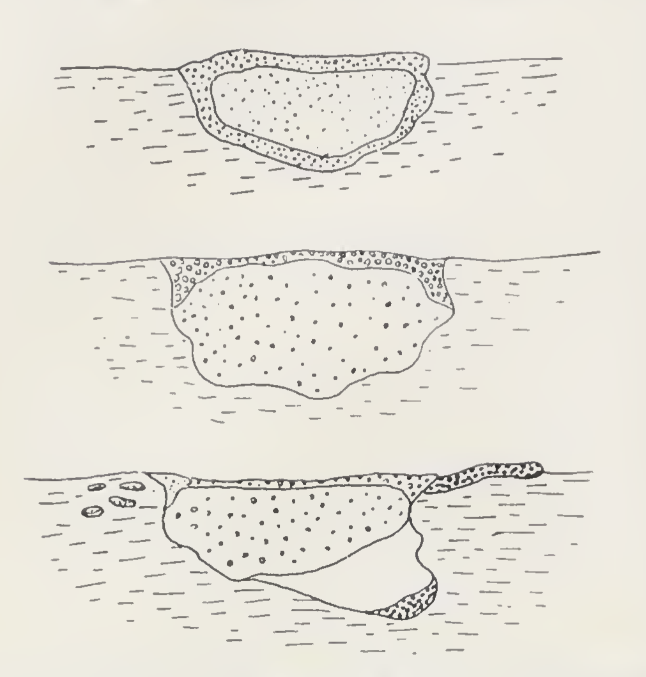
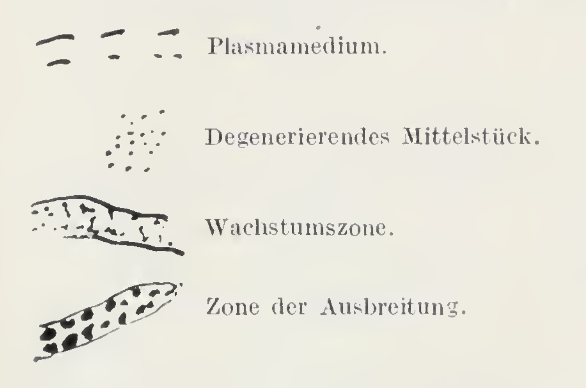


Abb. 9. Schnitt durch eine Gewebekultur. Ausbildung und Veränderung der Wachstumszone und Bildung der in das Plasmamedium eindringenden Zellstränge. Nach Champy 1913. La presse médicale.



Das Hinzufügen des Augenkammerwassers ließ den halbflüssigen Plasmatropfen schnell gerinnen, dies kann unter Umständen allein schon durch die Hinzufügung des Gewebestückchens geschehen. Das Augenkammerwasser ist dem Muskelextrakt, der häufig früher verwendet wurde, vorzuziehen, weil es leichter steril gewonnen werden kann und wie dieser eine gerinnungsfördernde Wirkung auf die im Plasma noch enthaltenen fibrinogenen Substanzen ausübt.

Der Tropfen ist halbstarr und mit einem der Vertiefung des Objektträgers zugekehrten Oberflächenhäutchen versehen, das ein Aneinanderfließen des Tropfens hindert, falls die Deckgläschen fettfrei sind. Staub-

sicher in den Drigalskischalen, an einem nicht zu hellen Ort, werden die Kulturen in Zimmertemperatur aufbewahrt.

Die schematische Zeichnung lehrt (Abb. 9 S. 20), was für Veränderungen wir zu erwarten haben, das Auswanden der Zellen, die sich teilen können im Rundhof oder Schleier, das Vordringen von Zellschichten zuerst in alle Teile des Mediums, in die primäre Wachstumszone, und später ein Absterben von Zellen in dieser und ein Vordringen von Zellschichten mehr zur Oberfläche des Tropfens in die sekundäre Wachstumszone In der Mitte bleibt unverändert der nicht reichlich mit dem Medium in Berührung kommende Teil des Gewebestückchens, der meistens nekrotisch wird, falls das Stückchen zu groß oder das Gewebe zu fest ist. Bei der Froschhaut ist Nekrose des Innern selten, bei Warmblütlergewebe häufig.

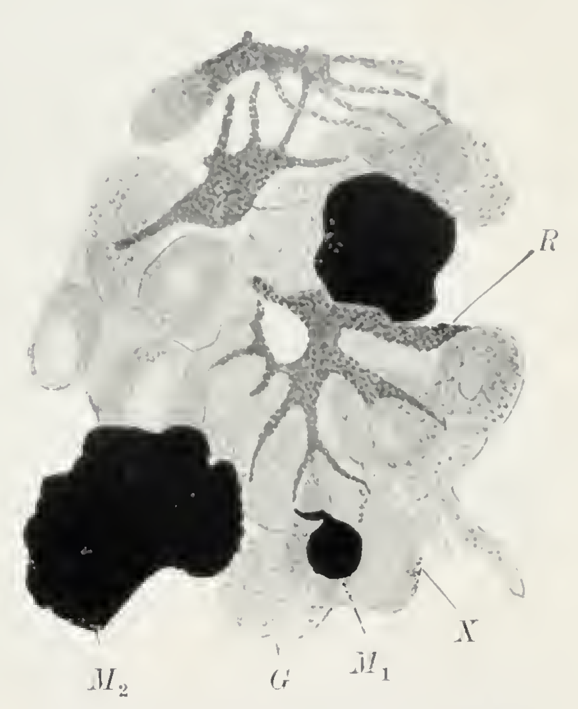


Abb. 10. Rana fusca nach W. J. SCHMIDT. 1920. (Anat. Hefte, MERKEL und BONNET, 58. Bd.) Rotzellen (*R*), Gelbzellen (*X*), Melanophoren (M_1 u. M_2) und Guanophoren (*G*) aus der Rückenhaut eines Weibchens (Balsamtotalpräparat). Die unter der Basalzelle gelegene Schicht ist eingestellt.

Es kann nicht genug darauf hingewiesen werden, daß, ehe das Züchten der Froschhaut beginnt, alle Elemente der Froschhaut bis aufs genaueste studiert werden und daß bei der Züchtung die vorher erkannten einzelnen Zellelemente, also hier Epithelzellen, Drüsenzellen, Basalzellen, kleine Melanophoren, große Melanophoren, Guanophoren, Lipophoren genau verfolgt werden. Die beigegebenen Bilder orientieren uns ausreichend über die einzelnen Elemente.

Man mache es sich zur unumstößlichen Regel, die zytologische Struktur des eingepflanzten Gewebes zuerst kennen zu lernen, hier also der Froschhaut. Die beigegebenen Flachpräparate, Abb. 10 und 11, zeigen die einzelnen Bestandteile, wie sie bei Aufsicht uns entgegentreten, der Schnitt, Abb. 12, die Zellschichtenfolge der Froschhaut.

Nachdem das eingepflanzte Stück sich gut ausgebreitet hat, wird es gezeichnet und gemessen. Nach wenigen Stunden sieht man schon einige Basalzellen aus dem Rand sich hervorbewegen. Nach ein oder mehreren Tagen hat sich diese Schicht der Zellen vergrößert. Diese Neubildung oder der primäre Rand besteht aus Basalzellen in überwiegender Masse, kleinen Melanophoren und einigen wenigen Guanophoren. Ab und zu hat sich eine dem Bindegewebe eigene Chromatophore in das Plasmamedium gestreckt: man sieht deutlich die verzweigten Ausläufer, in denen sich die Pigmentkörner bewegen.

Schon gleich nach der Einpflanzung, aber auch oft später, kann sich ein Epithelhäutchen, das aus den oberen verhornten Schichten der

Froschhaut besteht und das schon vorgebildet war, als dieses Häutchen in das Medium gelegt wurde, lösen. Es bleibt ohne Wachstumserscheinungen in dem Medium liegen; selbst wenn es in neues Medium ver-

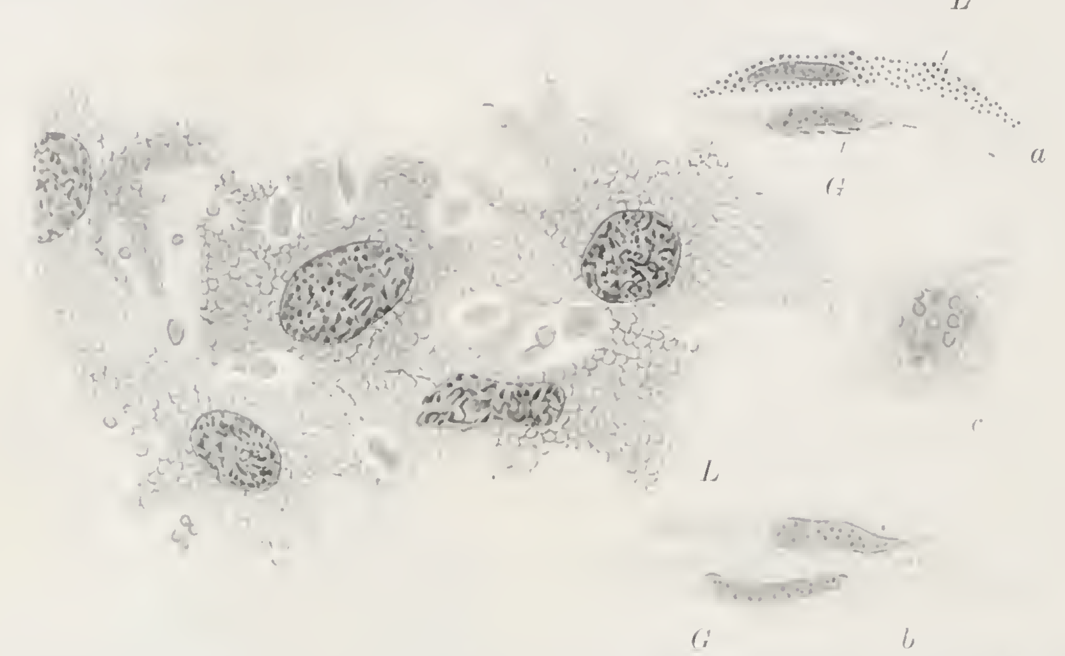


Abb. 11. Rana esculenta nach W. SCHMIDT. 1921. (Jenaische Zeitschrift, Bd. 57.) Aus einem mit Flemmings Gemisch fixierten und mit Pappenheims Methylgrün-Pyronin gefärbten Querschnitt der Rückenhaut. *a* u. *b*. Xantholeukosom im Durchschnitt: Kern der Guanophore (*G*) und der Lipophore (*L*). In den Guanophoren die Kristalle, in der Lipophore (*a*) die Granula sichtbar. *c*. Seitlicher Anschnitt einer Guanophore: locker gelagerte, schollenartige Guanikristalle, Kern matt durchschimmernd, die Gruppe von Guanophoren nach einem mit FLEMMINGS Gemisch fixierten, mit polychromen Methylenblau und Eosin gefärbten Flachschnitt der Rückenhaut.

pflanzt wird, behält es seine Struktur und Form unverändert. Verhornte Epidermiszellen und kleine Melanophoren setzen es zusammen. Diese Häutung des explantierten Stückes kann sich wiederholen. Sie entspricht einem dem Froschorganismus geläufigen Vorgang, der in der Kultur nur überstürzter und in kürzeren Perioden sich vollzieht.

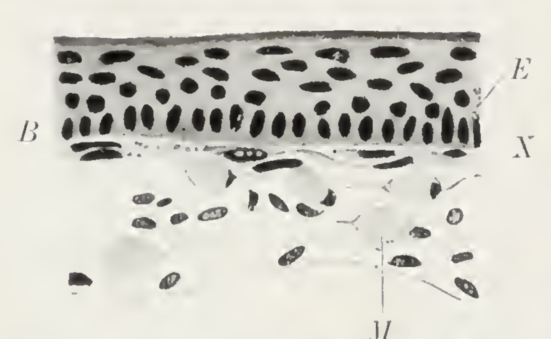


Abb. 12. Rana esculenta nach W. J. SCHMIDT. (Arch. für Zellforsch. Bd. 19.) Querschnitt durch den oberen Teil der Haut. Unter dem Epithel (*E*) die Schicht der Xantholeukosomen (*X*), darunter im Bindegewebe 5 durch Chlor gebleichte Melanophoren im Stadium der Ballung.

Während der nächsten Tage der Züchtung erscheint nun auch der sogenannte sekundäre Rand um das Explantat herum, während der primäre Rand aus mehreren Zellschichten bestand, breiten sich dieselben Zellarten, oft ohne Zusammenhang, in dem reichlich zur Verfügung stehenden Medium aus. Je älter die Kultur wird, je zusammenhängender kann diese Schicht werden, so daß sie während der nächsten Tage wie ein runder Schleier das Ursprungsgewebe umgibt.

Die Form der Zellen hat sich auch jetzt geändert. Wir züchteten dieses Stück ja in Froschplasma und Augenkammerwasser. Daher war es nicht nötig, vor acht Tagen das Medium zu wechseln, vorausgesetzt, daß die Kultur nicht trübe erschien. Fand sich reichlicher Zelldetritus,

so mußte das Medium sofort gewechselt werden. Dies geschieht, indem man das Stückchen vorsichtig aus dem Medium herausnimmt, es in Ringerlösung auswäscht und es dann wieder auf ein neues Deckgläschen mit neuem Medium einpflanzt. Es ist ratsam, als zweites Medium nicht sofort wieder Froschplasma und Augenkammerwasser zu nehmen, sondern vielleicht das Stück einen Tag in Locke-Lewis-Lösung zu lassen, weil es sich hierdurch von allen anhaftenden Unreinigkeiten befreit, und es dann erst wieder in das gleiche Medium zu tun. Dieser Wechsel

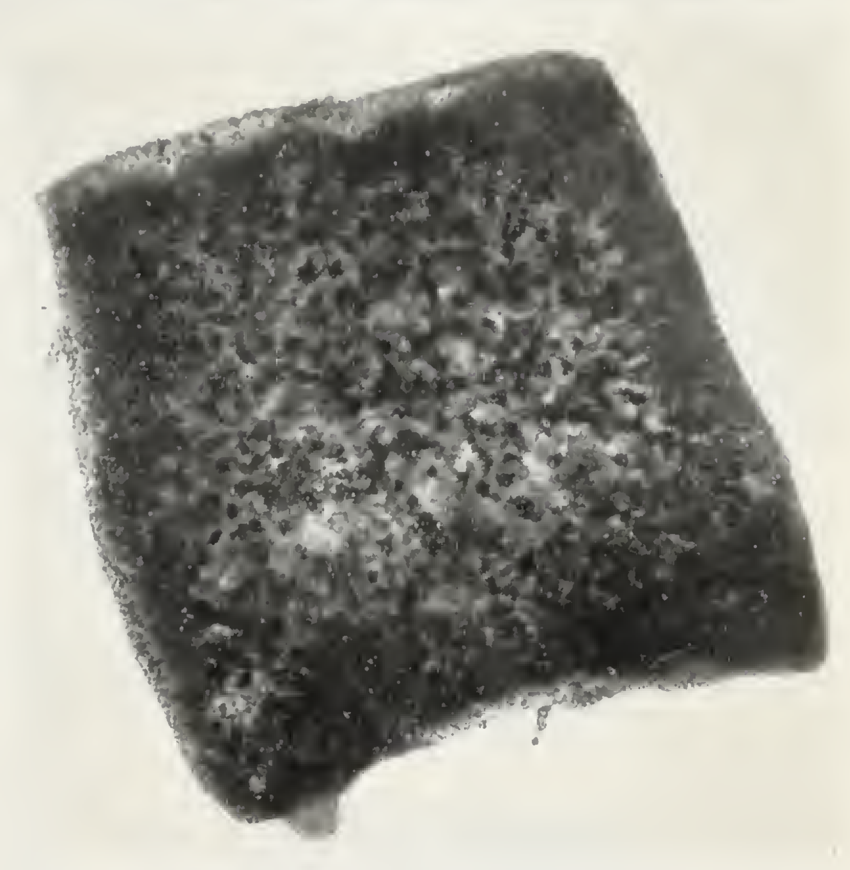


Abb. 13. Rana pipiens nach E. Uhlenhuth. 1914. (Journ. exp. Med., Vol. 20.) Rückenhaut drei Stunden in Froschplasma, Hühnerplasma und Froschmuskelextrakt ausgepflanzt. Bildung der sog. primären Randschicht. Die kleinen Punkte in diesem sind die Zellkerne, die größeren die kleinen Melanophoren. Photogramm nach gefärbtem Präparat.



Abb. 14. Ablösung des Epidermishäutchens von der Oberfläche der Froschhaut, kurz nachdem sie in Gewebekultur gesetzt ist. Skizze nach dem Leben. (R. Gassul, 1922, Arch. f. Entw., im Druck.)



Abb. 15. Epidermishäutchen, das unverändert selbst nach Umpflanzung bleibt. Skizze nach dem Leben. (R. Gassul, 1922.)

von Züchtung und Reinigung kann sich nun je nach dem Aussehen des Stückes wiederholen. Besser ist es, weniger oft zu wechseln, da mit

jeder Änderung die schon gebildeten Zellen, soweit sie nicht mit der Ursprungshaut in Verbindung stehen, wieder zerstört werden. Hat sich schon ein großer, sekundärer Hof gebildet, so kann man auch nur



Abb. 16. Beginnende Epithelbewegung und Auswanderung der implantierten Froschhaut. Skizze nach dem Leben. (R. GASSUL, 1922.)

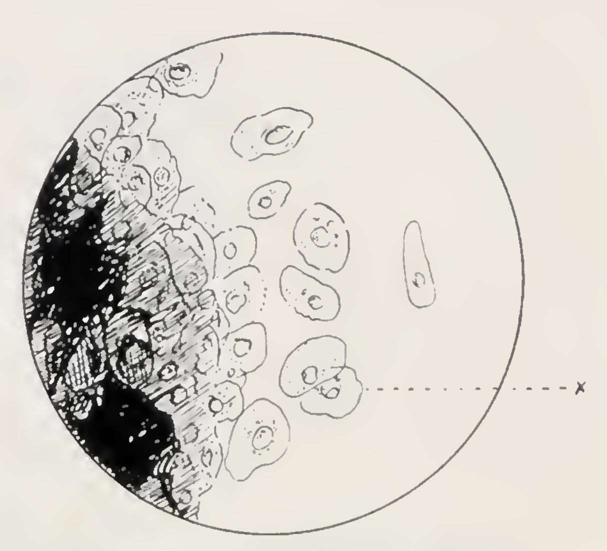


Abb. 17. Ausgewanderte Epithel- und Basalzellen im 4 Tage alten Präparat. Skizze nach dem Leben. (R. GASSUL, 1922.)

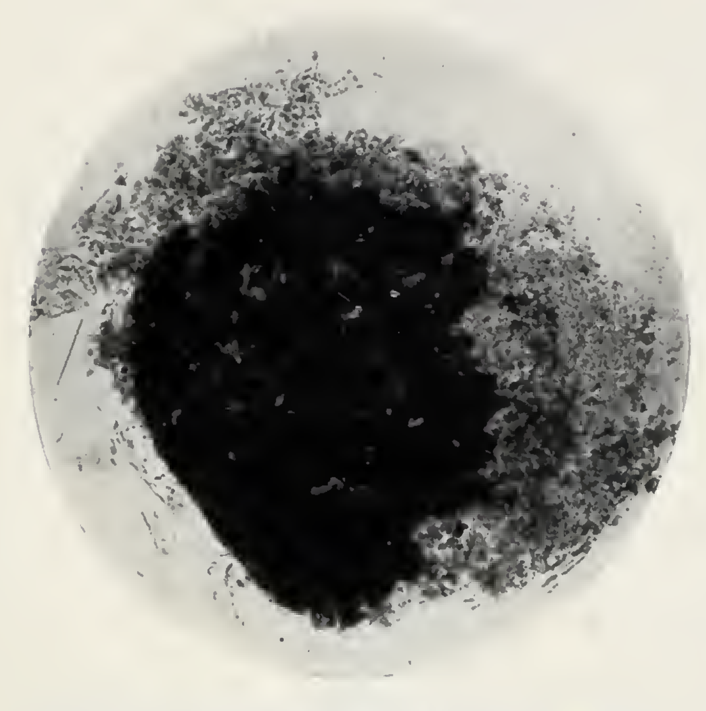


Abb. 18. Umgepflanztes Präparat, 4 Wochen alt, reichliche Zellvermehrung und Schichtenbildung. (Mikrophotogr. nach GASSUL, 1922. Gefärbtes Präparat.)

die Kulturflüssigkeit mit der Pipette absaugen und neue Nährflüssigkeit hinzusetzen. Die schönsten Präparate erzielt man gewöhnlich, wenn man nach dem ersten oder zweiten Tage wechselt und dann den Kulturen eine Woche Ruhe gönnt. Will man die Froschhaut wochenlang züchten, so muß man bedenken, daß nach jedem unvorsichtigen Wechsel sich erst der primäre und dann der sekundäre Rand neu bilden, daß aber gewöhnlich die zweite Bildung nicht so reichlich ausfällt wie die erste. Das eingepflanzte Froschhautstückchen ist während dieser Zeit durchsichtiger geworden, zum Zeichen, daß die Zellen, die den primären Rand bilden, zum Teil aus den Zellschichten stammen, welche die Haut des Frosches bildeten.

In den ersten Tagen der Züchtung teilen sich diese Zellen amitotisch. Später erst findet die Zellvermehrung durch regelrechte Mitosen

statt, die deutlich im lebenden Präparat mit Immersion nachzuweisen sind und sich auch leicht färberisch (Abb. 19) darstellen lassen. Es empfiehlt sich, Totalpräparate und Schnittpräparate in bestimmten Abständen von diesen Stückchen herzustellen, Konservierung mit ORTHscher Flüssigkeit und Färbung mit Hämatoxylin, und wenn man die Chromatophoren darstellen will, Fixierung mit 96 proz. Alkohol und Nachfärbung mit alkoholischem Safranin sind zu empfehlen. Beim Konservieren muß darauf geachtet werden, daß das Stückchen mit dem Medium zusammen konserviert wird. Es gelingt am besten, wenn man mit einer feinen Kapillarpipette, nachdem man vorsichtig den Tropfen mit dem Deckgläschen umgedreht hat, die Konservierungsflüssigkeit an den Rand des Tropfens ringsherum verteilt und langsam mit dem Konservieren bis zur Mitte vorgeht. Ist das Plasma sehr fest, was die Regel nur bei Züchtung in Hühnerplasma und Froschplasma ist, so kann man das Deckgläschen schwimmend auf die Konservierungsflüssigkeit legen. Es kommt hauptsächlich darauf an, alle ausgewanderten und neugebildeten Zellen mit zu konservieren. Dies gelingt erst nach einiger Übung. Das Einbetten geschieht in der üblichen Weise; am besten nimmt man für die letzten Stufen Chloroform-Alkohol, Chloroform-Paraffin usw. Man muß aber darauf achten, daß die Haut beim Einbetten nicht zu lange in den betreffenden Flüssigkeiten liegt, weil sie sonst zu hart wird. Feine Schnitte der explantierten Froschhaut färben sich am besten mit Delafield, wobei die Zeitdauer des Verweilens in der Farbe ausprobiert werden muß. Sind die Gewebe, wie die nekrotischen inneren Teile des explantierten Stückes, schon tot, so ist keine Kernfärbung möglich. Sehr oft wird sich nur der Zellinhalt diffus färben. In den Randpartien sind Mitosen dann leicht nachzuweisen. Vielleicht sind Basalzellen, die sproßartig aus dem eingepflanzten Stück in das Medium hineinwachsen, zu sehen, die Guaninkörner in sich aufgenommen haben, manche auch rote Blutkörperchen und sonstigen Zelldetritus. Die runden Zellen sind fast alle Abkömmlinge der Basalzellenschicht und der darüberliegenden Epithelschichten. Daß wirklich die ausgewanderten Zellen von den Schichten der Haut, die über den Basalzellen liegt,

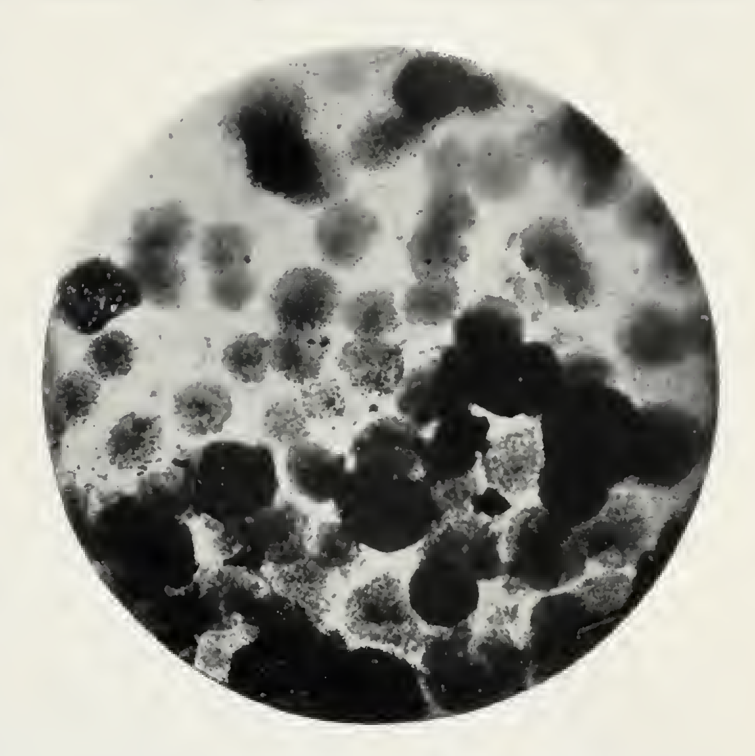


Abb. 19. In Teilung befindliche Zellen in einem 28 Tage alten, in Froschplasma und Augenkammerwasser gezüchteten Präparat. (Mikrophotogr. gefärbtes Präparat R. GASSUL, 1922.)

stammen, kann dadurch bewiesen werden, daß ein solches explantiertes Hautstück wieder implantiert wird. Ein Schnitt durch ein solches implantiertes Explantat (siehe GASSUL 1922) zeigt verminderte Anzahl Zellschichten über der Basalzellschicht.

Die Rolle des Unterhautbindegewebes im Froschhautexplantat ist noch nicht ganz geklärt. UHLENHUTH behauptet, daß das Bindegewebe des Leopardfrosches keine oder nur geringe Wachstumserscheinungen zeigt. Das Bindegewebe der hier gebrauchten Rana esculenta zeigt besonders in Froschlymphe oft Wachstumserscheinungen, die sich nachweisen lassen (siehe Abb. 20, 21, 22). Die Wundstellen der Bindegewebsfasern verdicken sich, kleinere Kerne lassen sich im Leben beobachten. Durch Apposition verlängern sich die Fasern nach der Peripherie hin, und die Kerne verteilen sich in ziemlich regelmäßigen Abständen in dieser ausgewachsenen Faser. Das Längenwachstum erfolgt zögernd. Im beigegebenen Bilde ist ein Faserbündel abgebildet, das sich in 19 Tagen um

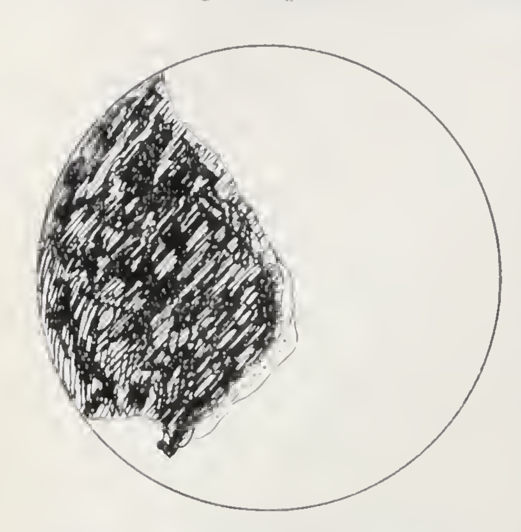


Abb. 20 zeigt das Auswachsen des Bindegewebes aus der Haut von Rana esculenta in drei nacheinander folgenden Stadien. Mikrophotogr. nach R. GASSUL, 1922. Gefärbtes Totalpräparat.





Abb. 21 u. 22 zeigen das Auswachsen des Bindegewebes aus der Haut von Rana esculenta in drei nacheinander folgenden Stadien. Mikrophotogr. nach R. GASSUL, 1922. Gefärbtes Totalpräparat.

25 μ vergrößert hat. Eine Regelmäßigkeit, wann die Bindegewebe, wann die Epithelgewebe am stärksten auswachsen können, ist nicht festgestellt. Es scheint nicht an den verwandten Kulturmedien zu liegen.

Verhalten der Froschhaut in festen, halbflüssigen und ganzflüssigen Medien. 2. Übung. Während des Studiums der Froschhaut, die sich nur in Plasmamedium und Augenkammerwasser befand, sind die anderen jetzt zu brauchenden Medien vorbereitet und sterilisiert. Außer den früher fertiggestellten Medien brauchen wir noch Hühnerplasma, das aber erst später von den Kursisten selbständig hergestellt wird. Jetzt wird es geliefert. Man hat also für die zweite Übung vorrätig:

Hühnerplasma, Froschplasma, Augenkammerwasser und RINGERsche Lösung für Kaltblütler. Man stelle sich 3 Mischungen her:

1/2 Teil Froschplasma und Augenkammerwasser,
1/2 ,, ,, ,, RINGERsche Lösung,
1/3 ,, Hühnerplasma, 1/3 Teil Froschplasma und 1/3 Teil Augenkammerwasser.



Abb. 23. Rückenhaut von Rana pipiens nach E. UHLENHUTH. (Journ. exp. Med. 1914, Vol. 20.) Photogramm nach dem Leben. 48 Stunden nach der Explantation. Zuchtmedium wie bei Präp. auf Bild 13. Zweischichtenbildung an drei Seiten des Explantats sichtbar.

Man behält noch zum Ansetzen einiger Kontrollkulturen ein wenig reines Froschplasma übrig. Dann setze man in der Weise, wie auf S. 17 beschrieben ist, Kulturen an, vielleicht 24 Kulturen:

3 Kulturen in reinem Froschplasma,
3 ,, ,, ,, Hühnerplasma,
3 ,, ,, ,, Augenkammerwasser,
3 ,, ,, RINGERscher Lösung,
3 ,, ,, Froschplasma und Augenkammerwasser,
3 ,, ,, Froschplasma und RINGERscher Lösung,
3 ,, ,, RINGERscher Lösung und Augenkammerwasser,
3 ,, ,, Hühner-, Froschplasma und Augenkammerwasser.

Hat man wenig Plasma und Augenkammerwasser, so kann man direkt beim Ansetzen mit mehreren Tropfenpipetten die Mischung vornehmen.

Gewöhnlich züchten wir, den natürlichen Verhältnissen möglichst entsprechend, in halbflüssigen Medien, also hier entspricht Froschplasma und Augenkammerwasser einem solchen. Frosch-, Hühnerplasma und Augenkammerwasser gemischt stellen ein festes Medium vor, die anderen Medien sind mehr oder minder flüssig. Hühner-

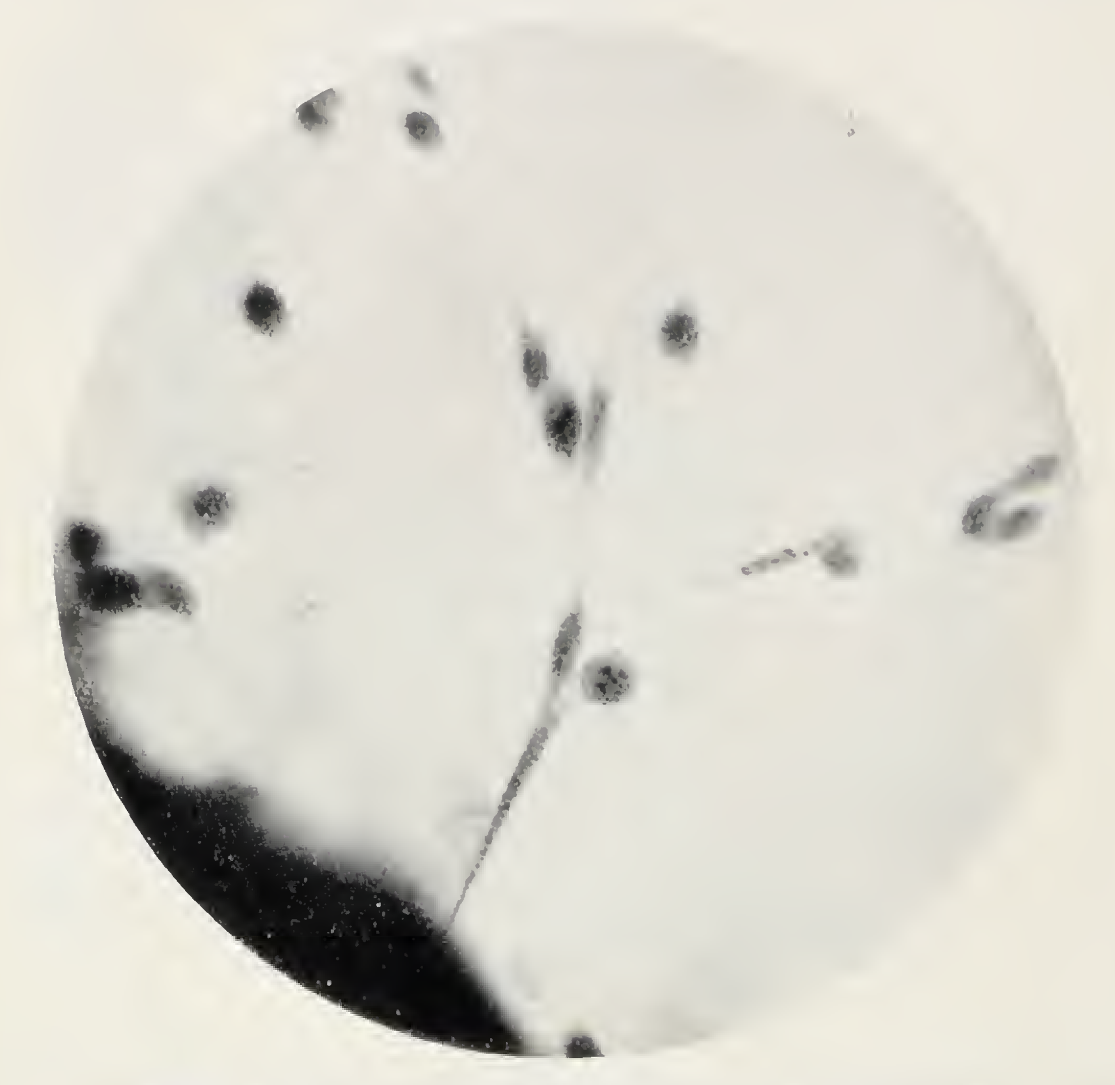


Abb. 24 wie Abb. 23, aber nach gefärbtem Präparat in einem sich verflüssigenden Medium. Die Formveränderung der Epithelzellen in diesem ist deutlich.

plasma allein ist ein sehr starres Medium, Ringersche Flüssigkeit allein ein absolut flüssiges Medium und für die Kultur unbrauchbar. Beide werden nur als äußerste Kontraste verwandt. In dem einem können die Zellen nicht sich fortschieben, da kein Widerstand vorhanden, in dem steifen Hühnerplasma ist dies auch nicht möglich, da das Medium zu starr ist und infolgedessen der Widerstand zu groß. Auswanderung von Zellen und Zellteilung sind hier fast nicht vorhanden, höchstens sind in das flüssige Medium einige durch das Zerschneiden des Gewebes aus dem Zusammenhang gelöste Zellen hineingeschwemmt, aber nicht aktiv hinausgewandert.

Die Epithelzellen haben in einem festen Medium gewöhnlich polyedrische Gestalt, von oben gesehen sind sie polygonal, im Schnitt kubisch; die Größe des Hofes ist gering, er besteht aus einer dichten Membran, erst nach 14 Tagen, wenn sich das Medium verflüssigt, nehmen die Zellen eine langgestreckte Form an den äußersten Rändern des Hofes an.

In einem halbflüssigem Medium bildet sich ein sehr großer Hof von Zellen, die um das Stück herum noch polygonal sind und zusammenhängen. Je weiter nach außen man die Zellen beobachtet, je loser wird ihr Zusammenhang, je langgestreckter wird ihre Form, einzeln wandernsie dann in das noch unverbrauchte Medium hinaus. Nach 20tägiger Züchtung sind viele Zellen stabartig und das Zellplasma ist von schaumiger Struktur.

In einem flüssigen Medium (Augenkammerwasser) nehmen alle Zellen zuerst eine gestreckte Gestalt an, die sich schon nach wenigen Stunden (18 Stunden) in eine runde verwandelt, in welcher die Zelle bis zu ihrem Tode verharrt. Zu einer echten Hofbildung kommt es nicht, überall hin werden Zellen und Zellschleier getrieben. Alle diese Veränderungen können nun in dem sich im Laufe der Zeit stets verflüssigendem Plasmamedium früher oder später in einer Kultur beobachtet werden.

Weiter haben wir genau das Schicksal der einzelnen Zellarten verfolgt und gefunden:

Die großen Melanophoren teilen sich nicht in der Gewebezüchtung. Nachdem sie den ersten Tag sich ausgestreckt haben, ziehen sie sich im Verlauf der nächsten Tage zusammen und bleiben im Stadium der Ballung bis zu ihrem Tode, der oft sehr spät erfolgt. Sind sie gestorben, so werden die kleinen Pigmentkörnchen von vielen anderen Zellarten phagocytiert. Dies erschwert natürlich das Erkennen der anderen Zellgruppen. Die kleinen Melanophoren sind oft in aktiver Bewegung anzutreffen. Die Guanophoren teilen sich sicher, Basalzellen und Drüsenzellen ebenfalls, Epithelzellen, soweit sie noch nicht verhornt sind. Über das Schicksal des Bindegewebes ist weiter oben berichtet, doch tritt bei Rana esculenta nicht das ein, was Uhlenhuth von dem Bindegewebe des Rana pipiens erzählt. Uhlenhuth findet, daß das Bindegewebe inaktiv bleibt und von den Epithelzellen überwuchert wird, so daß nach mehrwöchentlicher Züchtung eine Hohlkugel entsteht, die innen aus dem inaktiven Bindegewebe, außen aus neugebildeten Epithelzellen besteht. Es sollte hier an der lebenden Epithelzelle gezeigt werden, daß ihre Form eine Funktion der Festigkeit des Mediums ist und daß die Schnelligkeit der Auswanderung von Zellschichten und Zellen durch den gleichen Faktor bedingt ist.

II. Lebensäußerungen der Zellen und Gewebe in verschiedenen Medien.

Unter Lebensäußerungen der Zelle während ihres Verweilens in dem Kulturmedium sind zwei Gruppen zu unterscheiden, solche, die der Zelle auch im früheren Gewebsverbande eigen sein würden und

solche, die sich in dem Kulturmedium neu oder erneut zeigen. Als Zeichen des auch in der neuen Umgebung weiter ablaufenden Zellgeschehens werden die Fortsatzbildung der Zellen, die aktive Wanderung, die Fähigkeit zu phagozytieren, die sofortige Bildung von indirekten Teilungsfiguren bei embryonalen Zellen, das Durchführen der Zelldurchschnürung und die Weiterbildung der schon vorhandenen Zellstrukturen angesehen werden müssen.

Als Zellgeschehen, das sich nur in dem neuen Medium abspielt, werden wir die Entdifferenzierung oder den Abbau des Gewebes oder des Zellinhalts ansehen und das fortgesetzte Teilen des sich nicht abgebaut habenden, oder wenn das vorkommen sollte, das fortgesetzte Teilen der abgebauten, erwachsenen im Gewebeverbande sich nicht teilenden Zelle, das Auftreten direkter oder indirekter Teilungen, weiter das Neubilden von Zellstrukturen in vorher abgebauten Zellen, wenn auch das letztere Phänomen noch anzweifelbar ist.

Als Anpassungs- oder auch als Absterbeerscheinungen werden die Speicherung von Fett, Fettsäuren, und die Bildung von Vakuolen und der sog. Degenerationsgranula angesehen werden müssen, wenn sie nicht gewöhnlich in der Zelle vorkommen.

In diesem Abschnitte sollen einzeln das Auswandern, das Sichumwandeln, das Sichteilen von lebenden Zellen der verschiedensten Art in verschiedenen Medien beschrieben werden und die Fähigkeit der Zelle zur Riesenzellbildung und zur Phagozytose experimentell gezeigt werden. Dabei wird die Beobachtung der lebenden Zelle mit ihren Inhaltskörpern und die Darstellung derselben besonders betont. Ein Versuch wird gemacht, lebende und tote Zellen zu unterscheiden. Zu diesem Zweck werden wir uns erst die Mediumgewinnung bei Warmblütlern, Vögeln oder Säugern ganz zu eigen machen und nachdem erst die Plasmagewinnung der Säuger, als die leichtere Operation, beherrscht wird, lernt man auch Vogelplasma gewinnen. Die Katze ist wohl das geeignetste Objekt zum Beginn, die Ratte das schwerste, da Katzenplasma nicht so empfindlich ist wie Rattenplasma, das mitunter schon in der Pipette gerinnt.

Ich gebe einige kurze Anleitungen für die später zu brauchenden Tierarten Katze, Ratte, Huhn, Meerschwein, Maus, Hund und Mensch.

Katzenplasma: Die Katze muß vor der Operation narkotisiert werden. Man setzt sie entweder unter eine Glasglocke, in die zugleich ein mit Chloroform getränkter Wattebausch gebracht wird, oder man fertigt besser aus einem Stück Verbandstoff eine Maske, in die man zwischen trockener Watte das mit Chloroform getränkte Wattestück hineinlegt, ähnlich wie bei der Narkose beim Menschen und kontrolliert den Fortgang der Narkose durch Prüfen der Herzschläge. Wählt man dieses Verfahren, so muß man vorher die Katze an allen vier Pfoten an den Operationstisch anbinden und eben vor Beginn der eigentlichen Operation narkotisieren. Hat man keinen kräftigen Diener zur Hand, so narkotisiert man leicht unter der Glasglocke an und bindet dann zwecks tieferer Narkose das Tier fest. Die Narkose soll so tief sein, daß das Tier still-

liegt, jedoch soll jedes unnütz starke Narkotisieren vermieden werden, weil Gewebe von stark narkotisierten Tieren schlecht wächst und zu starkes Narkotisieren auch nachteilig auf das Plasma selbst einwirkt. Es müssen reichlich viel Röhrchen und große Röhrchen zum Auffangen des Blutes und des Plasma fertiggestellt werden, ebenso muß ein reichliches Instrumentarium bereit sein. Man gebraucht: mehrere gut-

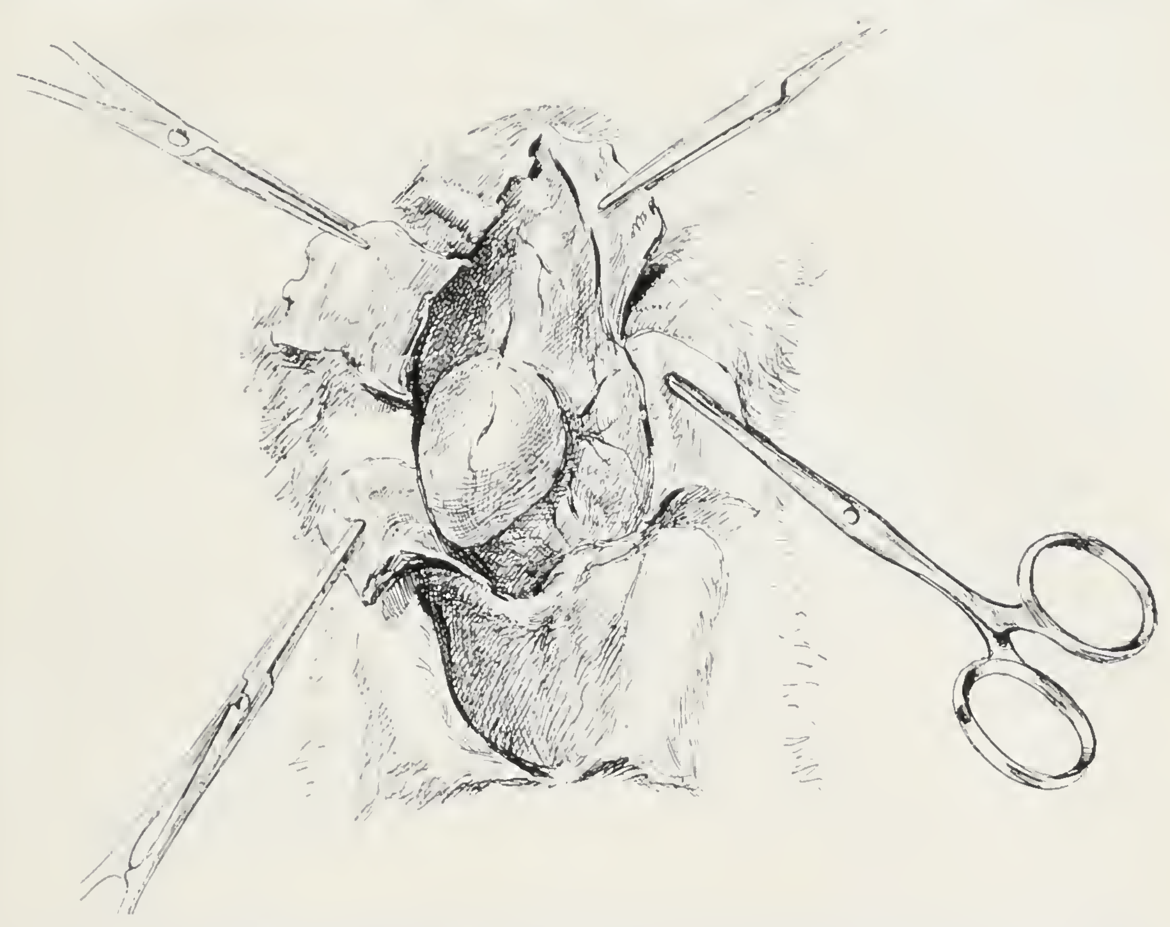


Abb. 25. Katze, Brustkorb geöffnet, Herz freigelegt, Perikard geöffnet. Es ist darauf zu achten, daß die Bauchhöhle geschlossen bleibt. Siehe Text (Original).

geschliffene Knopfscheren, Klammern zum Festklemmen des geöffneten Brustkorbes, große und kleinere Pinzetten, dabei eine mittelgroße Pinzette mit stumpfen Enden zum Hochheben des Herzens. Die Haut wird am Brustkorb mit Sublimat abgerieben, über dem Brustbein eingeschnitten, zur Seite geklappt und festgeklemmt. Die freigelegte Muskulatur wird mit RINGERscher Lösung abgespült. Nun hebt man vorsichtig das Sternum hoch am Processus xiphoideus und schneidet mit dem stumpfen Ende der Knopfschere nach unten mittels eines Medianschnittes in den Brustkorb ein bis nahe an den Hals. Die beiden Hälften des Brustkorbes (Abb. 25) werden durch einen Transversalschnitt weiter geöffnet, wobei man die dort liegenden Gefäße beachten muß und so unblutig wie möglich arbeiten soll, und dann zur Seite hin festgeklemmt. Man soll so rasch wie möglich arbeiten, damit man die Narkose nicht zu lang auszudehnen braucht und schnell in das schlagende Herz einstechen kann. Mit einer kleinen Knopfschere eröffnet man den Herzbeutel, stützt das Herz von unten mit der stumpfendigen Pinzette und

sticht mit der Kanüle in den Ventrikel ein. Es ist gleich, an welcher Stelle man einsticht, da durch das Einstechen mit der verhältnismäßig starken Kanüle der Ventrikel so heftig verletzt wird, daß von jeder Stelle das Blut in die Spritze einströmt (Abb. 26).

Alle weiteren Handgriffe erfolgen genau so, wie sie schon beim Frosch beschrieben sind, mit dem wichtigen Unterschied, daß noch



Abb. 26. Katze. Der Moment der Blutentnahme. Es ist darauf zu achten, daß die Spitze der Kanüle nicht das Herz durchsticht und daß der Stempel der Spritze erst hochgehoben wird, wenn die Nadel gut in das Herz eingeführt ist. Siehe Text (Original).

größere Schnelligkeit notwendig ist, eine Hauptbedingung zur Gewinnung einer guten und reichlichen Menge Plasma. Zwischen Blutentnahme und Zentrifugieren darf höchstens ein Zeitraum von Sekunden vergehen. Das gewonnene Plasma wird in die schon früher beschriebenen dickwandigen Reagenzröhrchen abpipettiert, steril verschlossen. Gebraucht man das Plasma nicht gleich, so kommt es in eine Gefrierlösung, die man einen Tag über den anderen wechselt. Bei heißem Wetter muß jeden Tag gewechselt werden. Das Plasma ist bis zu acht Tagen lang brauchbar. Wenn man Versuche anstellt, bei denen

es auf eine bestimmte Hydrogen-Ionen-Konzentration ankommt, soll es besser vermieden werden, vorher gewonnenes Plasma zu gebrauchen.

Bei großen Tieren wird man zur Plasmagewinnung nur dann das Herz benutzen, wenn sehr viel Plasma gebraucht wird (etwa zu Kurszwecken). Sonst empfiehlt es sich, Blut aus der Karotis zu entnehmen, nachdem das Gefäß mobilisiert und das Blut gestaut worden ist. Dieses Verfahren erfordert jedoch größere Übung und ist für Kurszwecke nicht ratsam, weil eben oft, falls nicht sehr schnell gearbeitet wird, das Blut gerinnt. Ich lasse den Kursisten selbst von Anfang an alle Operationen ausführen und ziehe deshalb zuerst die Blutgewinnung aus dem Herzen vor.

Beim Hund entnimmt man das Blut für die Plasmagewinnung aus der vorderen Brustvene mittels einer vaselinierten Hohlsonde. Das zuerst ausfließende Blut läßt man unbenutzt, da leicht gerinnungsfördernder Gewebssaft mit einfließt, der durch das Einführen des Schneppers in die Venenwand mit in das Blut gelangen kann. Das später quellende Blut läßt man in die paraffinierten Röhrchen einströmen und verfährt weiter in der schon geschilderten üblichen Weise.

Bei der Blutentnahme vom Kaninchen ist die allgemeine übliche Art, aus der Ohrvene Blut zu gewinnen zur Plasmabereitung nur selten mit Erfolg angewendet. Es währt zu lange Zeit, ehe man genügend Blut erhält. Bei dieser verhältnismäßig langsamen Entnahme erwärmt die Hand zu stark die eisgekühlte Spritze, und in den meisten Fällen gerinnt das Blut schon beim Zentrifugieren. Will man das Tier schonen, so muß man auch hier die Karotis freilegen; die beste Art der Gewinnung bleibt immerhin das Einstechen in das schlagende Herz. Auch bei Herzpunktion, sei es z. B. ein Meerschweinchenherz, das man punktiert, ist im allgemeinen die Blutentnahme bei diesem Verfahren zu langsam. Vielleicht aber läßt sich diese sparsamste Methode noch ausbauen.

Die Punktion kann in folgender Weise (nach Friebös) ausgeführt werden: Man schneidet über dem Herzen die Haare ein wenig ab und reibt die Hautstelle mit Jod ein. Man tränke die ausvaselinierte Nadel mit Paraffinum liquidum und steche mit der Spritze wie üblich in das Herz ein. Auch hier nehme man nicht das erste Blut, weil vielleicht Gewebssaft in ihm enthalten sein kann.

Aus Sparsamkeitsrücksichten werden oft tragende Tiere zur Plasmagewinnung benutzt, man meint, zugleich mit der Plasmagewinnung, auch die Embryonen verwenden zu können. Ich möchte dies Verfahren nur dann empfehlen, wenn das Tier erst im Beginn der Trächtigkeit sich befindet. Stark trächtige Tiere erweisen sich für die Narkose sehr ungeeignet. Auch habe ich oft empirisch festgestellt, daß das Wachstum im Plasma tragender Tiere sehr minimal ist. Vielleicht aber ist auch das bei diesen Tieren nötige starke Narkotisieren die Ursache, daß Gewebe in dem Plasma tragender Tiere nicht wachsen.

Bei der Ratte und dem Meerschweinchen verfahre man zur Blutentnahme aus dem Herzen wie bei der Katze beschrieben ist, mit Ausnahme beim Einschneiden in den Brustkorb. Bei den eben genannten Tieren eröffnet man den Brustkorb nicht durch Medianschnitt, sondern man



Abb. 27. Ratte. Im Gegensatz zur Katze ist hier mit zwei Seitenschnitten der Brustkorb geöffnet und das Brustbein mit dem Teil der ihm anliegenden Rippen zurückgeklappt. Siehe Text (Original).

schneidet beiderseitig beim Rippenknick ein (Abb. 27), den Knopf der Schere nach unten gerichtet, klappt dann das gelöste Stück rostat zurück und befestigt es mittels einer Klammer. Alle weiteren Handgriffe sind den bei der Katze beschriebenen gleich.

LAMBERT und HANES geben eine ausgezeichnete Anleitung, wie bei kleineren Tieren schnell Plasma aus Gefäßen gewonnen wird. Sie prä-

parieren z. B. bei der Maus die Karotis frei, binden sie oberhalb der Einschneidestelle ab und befestigen sie unten mit einer Arterienklammer. Dann wird scharf in die Karotis eingeschnitten. Die Ränder des Einschnittes werden mit feinen Klammern festgehalten und das Gefäß ganz durchtrennt. Das Ende des Gefäßes und die es haltenden Klammern sind mit Olivenöl bedeckt. Dann wird die Klammer unterhalb geöffnet, und das Blut kann jetzt in die paraffinierten Glasgefäße von sehr schmalem Durchmesser fließen. Das Zentrifugieren und die übrigen Operationen sind den früher geschilderten gleich. Die ersten Tropfen werden nicht gebraucht. Junge Ratten geben gewöhnlich 1 ccm Blut, wenn das Tier getötet werden soll, so kann man zweimal soviel nehmen, aber man soll solches Blut nicht gebrauchen, wenn man Immunitätsstudien machen will.

Beim Menschen benutzt man, wie sonst bei der Blutentnahme üblich, die Armvene. Das Menschenplasma, das ohne Narkose ja leicht gewonnen werden kann, wie auch ja bei dem Hund, verflüssigt sich leicht, ohne Zusatz von Hühnerplasma ist es unbrauchbar.

Besonders eingehend möchte ich die Gewinnung von Hühnerplasma schildern. Da fast das ganze Jahr Hühnerembryonen zu haben sind und man mindestens dreimal dasselbe Huhn zur Plasmagewinnung brauchen kann, so empfiehlt es sich, dies besonders zu üben.

Man soll sich zur Regel machen, daß alle Tiere, welche man zur Plasmagewinnung gebrauchen will, mindestens einige Tage vor der Operation im Stall selbst zu beobachten. Man füttere sie in dieser Zeit mit Nahrung, die viel Wasser enthält. Wenn man seine Tiere selbst aufzieht, was ja bei der zumeist gebrauchten Ratte sehr leicht ist, wird man am sichersten sein, normale, noch zu keiner anderen Operation gebrauchten Tiere zu haben.

Operation am Huhn: Beim Huhn gewinnt man zunächst Plasma durch Blutentnahme aus einer Flügelvene, um das Tier zu schonen und für mehrere Blutentnahmen zu gebrauchen. Man legt das Tier auf dem Rücken auf den Operationstisch nieder, nachdem man ihm sorgsam eine Watteunterlage untergelegt hat, damit es nicht zu sehr auskühlt. Nun bindet man die Beine und darnach die Flügel mit Binden fest, recht behutsam, ohne das Blut zu stauen. Unter den Flügel, in den man hineingehen will, legt man eine Watterolle, um ihm eine erhöhte, sichere Lage zu geben. Die Operationsstelle befreit man vorsichtig von allen Federn, die man nicht abreißen, sondern abschneiden soll. Sodann reibt man das Operationsfeld kräftig mit einem Wattebausch und steriler Kochsalzlösung ab, um allen etwa anhaftenden Schmutz zu entfernen. Nachdem man das Huhn beruhigt, im Notfalle ihm eine leichte Chloroformnarkose gegeben hat, hebt man die Flügelhaut mit der Pinzette auf und schneidet mit einer scharfen Knopfschere (Abb. 28) über dem Gefäße in die Haut ein, drängt stumpf ab und klemmt links und rechts mit je einer Péanschen Klammer die Hautränder fest. So erhält man eine ziemlich weit offene Operationsstelle (Abb. 29), an der man das Gefäß deutlich liegen sieht. Das Gefäß wird nun vorsichtig hochgehoben und der Blutstrom mit einer Arterien-

klemme abgestaut. Bevor man nun zur Blutentnahme einsticht, wird es nötig sein, die Narkose zu verstärken. Man muß das Tier gut beobachten und die Stärke der Narkose genau austarieren, so daß das Tier zwar ruhig liegt, aber auch die Narkose gerade so leicht wie



Abb. 28. Huhn zur Operation vorbereitet. Die Rolle, welche den Flügel hebt, ist nicht sichtbar. Auch das den Kopf bedeckende Tuch ist fortgelassen. Siehe Text (Original).

möglich ist. Schnarcht das Huhn, so ist die Narkose gut gelungen. Sobald der Blutstrom angestaut ist, sticht man mit der eisgekühlten Spritze in das Gefäß ein und löst im gleichen Augenblick die Klammer, so daß das Blut schnell in ziemlich großer Menge einströmt. Die Zentrifugenröhrchen, welche zum Auffangen des Blutes dienen, müssen beim Huhn in größerer Anzahl bereitgestellt werden. Man nimmt auch etwas größere Plasmaröhrchen, da man mit größeren Blutmengen zu rechnen haben wird.

Im allgemeinen unterscheiden sich die einzelnen Handgriffe und die Art der Arbeit nicht wesentlich von der Art der Plasmagewinnung, die vorher schon bei anderen Tieren beschrieben ist, bis auf alle die Einzelheiten, die durch die Beschaffenheit des Tieres selbst bedingt

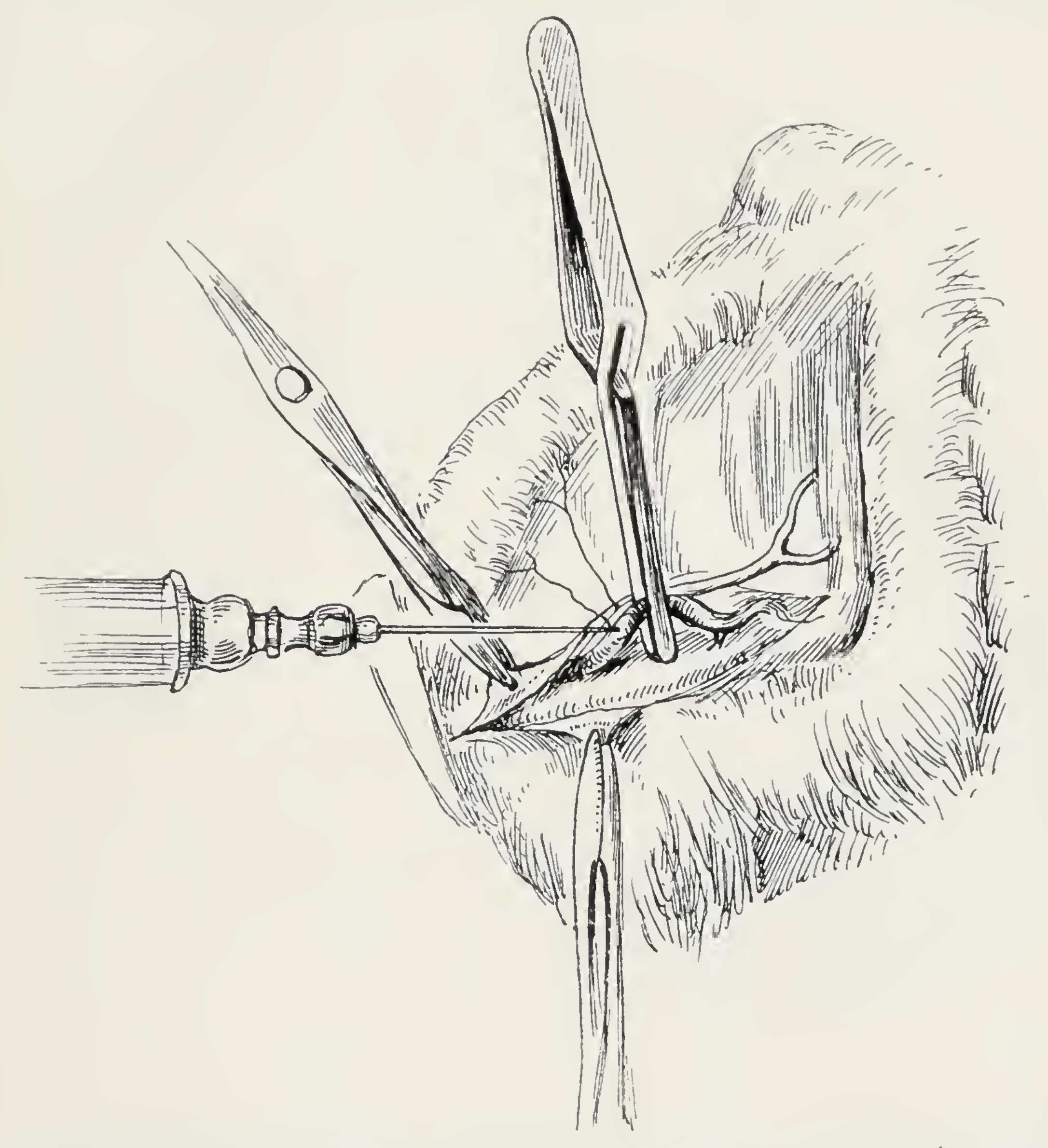


Abb. 29. Flügelvene des Huhnes zur Blutentnahme vorbereitet. Die beiden PÉANschen Klammern rechts und links klemmen die abpräparierte Haut zurück. Die zum Stauen des Blutes benutzte Arterienklemme darf nicht zu massiv sein. Siehe Text (Original).

werden. Zu sagen wäre nur noch, daß beim Huhn, ganz gleich, ob man aus einem Gefäß oder aus dem Hühnerherzen das Blut gewinnt, noch rascher gearbeitet werden muß als etwa bei der Ratte, da die Temperatur des Hühnerblutes 38° C ist. Ist das Tier sehr jung, so braucht man beim Blutentnehmen aus den Gefäßen meist nicht in die Muskulatur einzuschneiden, bei älteren Tieren dagegen muß das Gefäß stumpf und unblutig freigelegt werden. Zu junge Tiere sind für die Operation ungünstig, weil ihre Haut leicht einreißt, am besten verwendet man 7—8 Monate alte Tiere. Dasselbe Huhn kann öfter zur Blutentnahme benutzt werden. Man entnimmt aus den Flügelgefäßen erst an einer, dann an der anderen Seite und zuletzt aus dem Herzen. Am besten

wird das Tier nach der Entnahme aus dem Gefäß sofort verbunden. Man läßt es bis zur nächsten Entnahme etwa $^1/_2$ Jahr laufen. Dabei gelingt es, daß man ein paarmal aus demselben Gefäß Blut entnehmen kann, oft aber vernarbt die schon früher benutzte Stelle nicht gut und die Verwachsungen stören dann, wenn man diese Stelle später wieder benutzen will.

Weiter brauchen wir außer Physiologischer Kochsalzlösung, Ringerscher Lösung, Loke-Lewisscher Lösung, alles natürlich für Säugetiere angesetzt, Embryonalextrakt, den wir auf folgende Weise bereiten.

Embryonalextrakt: Die bequemste Art ist folgende: Aus dem trächtigen Uterus beim Säugetier oder aus dem Ei beim Vogel wird der Embryo steril entnommen und in steriler Ringerlösung abgespült. Das so vorbereitete Tier wickelt man in ein steriles Gazeläppchen, von dem die Ringerlösung zum größten Teil wieder aufgesogen wird. Der Embryo wird dann in sterilen Glasgefäßen mit sterilen Instrumenten schnell zerschnitten und verrieben und der Embryonalbrei in ein steriles, mit einem Deckel versehenen Filter gebracht, auf dem man vorher ein steriles, mit Ringer angefeuchtetes Stück Filtrierpapier leicht angedrückt hat. Da der Embryo sehr wasserreich ist, werden sich immer Tropfen von Flüssigkeit abfiltrieren, die möglichst sofort, verdünnt wie 1:3, zu benutzen sind, höchstens aber einige Stunden auf Eis gehalten werden können, da sonst die wachstumsbeschleunigenden Substanzen nicht mehr bei späterer Verwendung zu wirken scheinen. Außer dem geschilderten Verfahren, Embryonal-Extrakt zu gewinnen, wird noch folgende Methode nach Drew empfohlen:

Man schneidet Mäuse- oder Ratten-Embryonen in feine Stückchen und bringt sie in ganz wenig Drewsche Flüssigkeit (siehe S. 104). Diesen Brei läßt man 2—3 mal frieren und auftauen, damit die Zellen so viel wie möglich sich aus dem Verbande lösen. Dann zentrifugiert man, bis eine klare oder schwach opaliszierende Flüssigkeit sich absetzt. Drew empfiehlt 2 Teile dieser Flüssigkeit und 3 Teile der Drewschen Flüssigkeit, die das Plasma ersetzen soll.

A. Auswanderung der eingepflanzten Zellen gezeigt an der Milz.

Nachdem wir erst in Gedanken uns die nachfolgenden Schritte des Experiments zurechtgelegt, alle Instrumente und Lösungen bereitgestellt haben, so nehmen wir die bis zu diesem Zeitpunkt auf Eis gestellte Milz. Gerade hier ist die Auswanderung der Zellen am besten zu beobachten, und die Anfertigung von Deckglaskulturen bei Milz und auch bei Knochenmark ist verhältnismäßig leicht. Um Tiere zu sparen, benutzt man dasselbe Tier zuerst zur Plasmagewinnung, nimmt die Milz dann steril heraus und bewahrt sie, bis man sich die Glasschalen, sterile Instrumente und Lösungen zum Kulturenansetzen zurechtgestellt hat, auf Eis auf. Hat man 2 Zimmer zur Verfügung, so stellt man diese Dinge schon vor der Operation auf. Je schneller man arbeitet, je besser. Nachdem die Milz — man nimmt entweder

Katzen-, Ratten-, Meerschwein- oder Hühnermilz, nur nicht Mäusemilz, weil die Zellen sehr klein sind — aus dem schwach narkotisierten, besser geschächteten — falls ein frisches Tier verwandt wird — Tiere herausgenommen ist, wird mit dem Ansetzen der Kulturen in der früher geschilderten Weise verfahren. Man wird gut tun, die Milz ein paarmal in RINGERscher Lösung abzuwaschen und dann aus dem Inneren der Milz kleine Stückchen in das Nährmedium einzusetzen. Wir züchten als dritte Übung die Milz:

in arteigenem Plasma,
in Plasma und RINGERscher Lösung,
in Plasma und Embryonalextrakt,
in reiner RINGERscher Lösung,
in reinem Serum.

Man wähle am besten möglichst gleichgroße Stücke, damit man später einen Anhalt hat, wie stark die Auswanderung der Zellen stattgefunden hat.

Am nächsten Tage wird man deutlich, schon mit bloßem Auge, weißliche Ringe um das eingepflanzte Stückchen sehen können. Der Durchmesser dieses Kreisringes ist wahrscheinlich größer bei den in Serum eingesetzten Stückchen. Gerade hier wandern die Zellen am schnellsten aus. Am dichtesten ist der Zellenkranz bei den Plasmamedien, auch haben hier die Zellen ein normales Aussehen, während in dem Serum abenteuerlichen Pseudopodien, stark ausgezogenes Zellplasma und blasse Kerne sich zeigen. Viele Zellen sterben ab. In dem Plasma der Katze können die Milzzellen sehr lange leben und es fällt besonders der Reichtum an eosinophilen Leukozyten auf. Am übernächsten Tage wird man diesen Zellenkranz unter der Lupe mit einer feinen Kapillarpipette absaugen und in ein neues Medium bringen (Abb. 30). So ist man sicher, nur ausgewanderte Zellen zu erhalten, die dann nach weiteren 2 Tagen wieder in neues Medium verpflanzt werden müssen. Unter Umständen findet auch eine Vermehrung einiger Elemente statt.

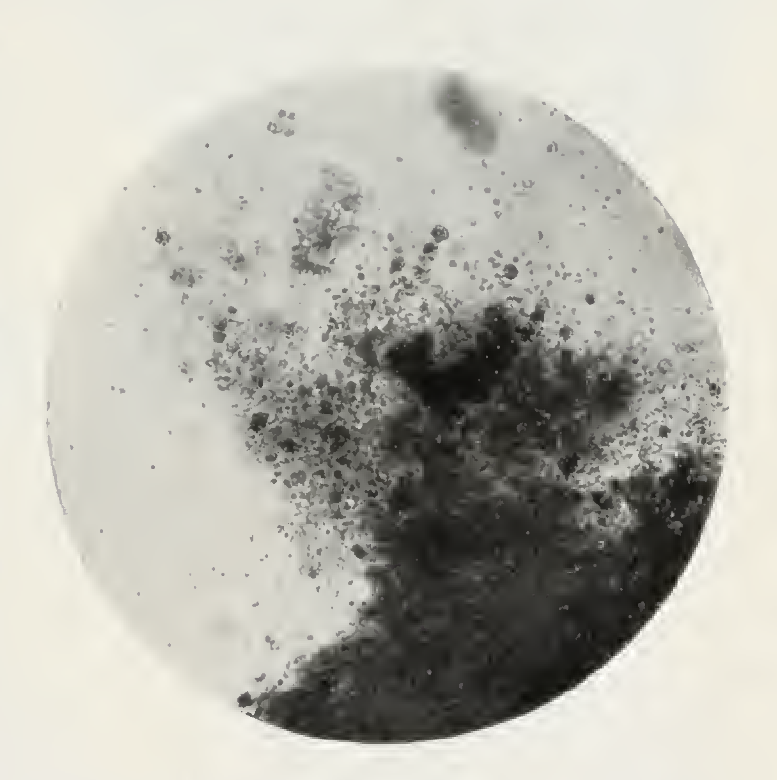


Abb. 30. Auswanderung der Zellen der erwachsenen Katzenmilz in homogenem Plasma, 3tägige Kultur, ein Teil des Hofes ist zwecks Umpflanzung schon abpipettiert und auf ein neues Deckglas gebracht (im Präparat links). Mikrophotogramm nach dem Leben (Original).

Die erwachsene Milz, „die Stätte des Unterganges vieler Erythrozyten und der Neubildung vieler weißer Blutzellen" enthält außer

Bindegewebszellen, die uns hier nicht interessieren, infolgedessen viele Erythrozyten und viele weiße Blutzellen. Dazu kommt — und das ist für uns besonders wichtig — ein weitverzweigtes Venen- und Arteriensystem. Die Wand der kapillaren Milzvenen ist eine durchbrochene. Sie enthält retikulär angeordnete Zellen, welche ein Maschenwerk bilden (Netzsyncytium). Betrachten wir unser eingebettetes Stück am ersten Tag, so finden wir eine ganze Reihe von großen blasigen Zellen, deren Kern sich mit Giemsa blau färbt. Diese Zellen sind Zellen aus dem Retikulum. Sie können phagozytieren. Am zweiten Tage findet man in ihnen sehr häufig die Reste roter Blutkörperchen (Abb. 31).



Abb. 31. Katzenmilz. Zellen des Reticulums aus der Peripherie des Hofes. Mikrophotogramm nach einem mit Giemsa gefärbten Totalpräparat (Original).

Sowohl die eosinophilen Leukozyten der Milz als auch des Knochenmarks teilen



Abb. 32 u. 32a. Riesenzellbildung in der Rattenmilz in Menschenplasma 5 Tage gezüchtet. In der Mitte der beiden vielkernigen Riesenzellen eine vakuolige Sphäre, um welche sich viele Kerne lagern. Um den Kernkranz Fettgranula. Nach LAMBERT und HANES, 1911. Journ. exp. Med., Bd. 14.

sich schnell hintereinander in den ersten drei von uns gewählten Medienbis sie als kleine, punktgroße Einheiten endlich zugrunde gehen. Sie können auf zweierlei Arten sterben. Entweder sie sterben durch Ausstoßen sämtlicher eosinophiler Granula oder auch durch Ausstoßen des Kernes, der vorher pyknotisch geworden ist. Nach 2 Wochen ungefähr finden sich nur kleine Lymphozyten und retikuläre Zellen und eventuell Bindegewebszellen der Milzkapsel vor. Eine progressive Entwicklung der Zellen machen nur die Lymphozyten in einem Plasmamedium mit Serum durch bis zu ihrem schon morphogenetisch vorgeschriebenen Ziele, nämlich in Plasmazellen; eine Rückbildung der Lymphozyten in Bindegewebszellen ist von mir nicht beobachtet worden. Man hüte sich, Milzläppchen mit etwas Fett einzupflanzen, weil dadurch die an sich schon schwierige mikroskopische Deutung der Bilder noch kompliziert wird. Die dem eingepflanzten Milzstückchen eigenen Riesenzellen wandern sehr selten in den freien Zellenhof. Man findet sie aber noch in Schnitten durch das im Plasma eingepflanzte Stück. Doch bilden sich auch vielkernige Riesenzellen in der Milz (Abb. 32 u. 32a). Hat man die eingepflanzten Stücke

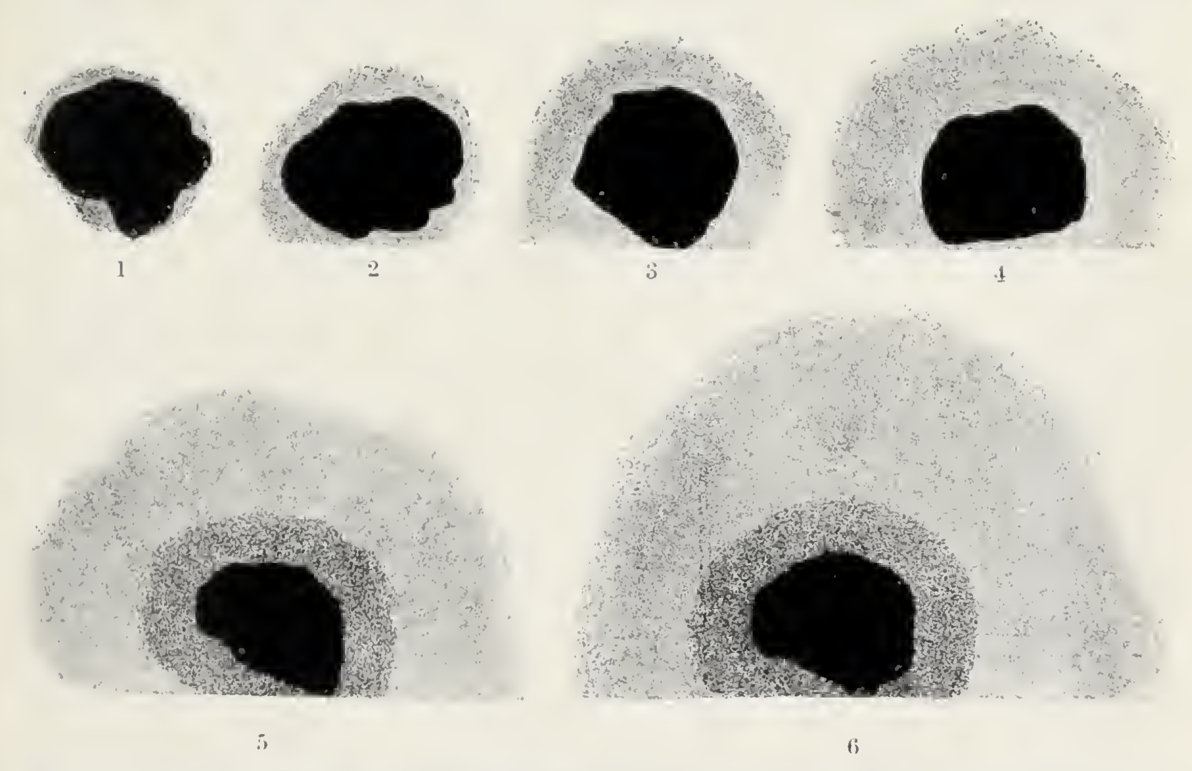


Abb. 33. Embryonale Milz vom 16 Tage alten Embryo. 1. drei Tage gezüchtet in Ringer allein, 2. in Ringer und 2% Agar, 3. in Serum, 4. in frischem Serum und 2% Agar, 5. in auf 50° C erhitztem Serum und 2% Agar, 6. in auf 50° C erhitztem Hühnerplasma. Nach INGEBRIGTSEN, 1912. Journ. exp. Med. Bd. 16.

sehr häufig umgebettet, so bleibt schließlich nur das retikuläre Gewebe zurück, von dem kleine, basophil sich färbende, lymphozytenähnliche Zellen sich ablösen.

So wenigstens verhält es sich bei der Milz der Katze, der Ratte, des Meerschweinchens, des Huhnes. Es kann sein, daß das Milzgewebe anderer Tierarten wieder andere Erscheinungen hervortreten läßt. Die embryonale Milz (Abb. 33) kann — falls vorhanden — als Vergleichsobjekt betrachtet werden.

4. Übung. Man nehme die Milz eines 16 Tage alten Hühnerembryos und habe folgende 6 Medien zurechtgestellt:

RINGERsche Lösung, RINGERsche Lösung und 2% Agar, auf 50° C erhitztes Hühnerserum u. 2% Agar nicht erhitztes Hühnerserum u. 2% Agar u. Hühnerplasma.

Agarlösung. Eine 2% Lösung Agar in destilliertem Wasser hält man im Wasserbad zwischen 60—65° C flüssig. Hat man das Serum bereitet, so nimmt man die Agarlösung aus dem Wasserbade und läßt sie bis ca. 40° C abkühlen. Dann mischt man die Agarlösung vorsichtig mit dem Serum in der gewünschten Zusammensetzung. Sofort müssen dann die Kulturen angesetzt werden. Sind in der Lösung kleine Stückchen geronnener Agar, so muß man den Prozeß wiederholen.

Serumbereitung. Man mache es sich zur Regel, daß man aus dem Herzen des Tieres, von dem man schon 2—4 Röhrchen Blut zur Plasmagewinnung entnommen hat, noch Blut für die Serumgewinnung entnimmt. Nach ein paar Minuten hat sich das Herz gewöhnlich so voll geschlagen, daß man Blut für die Serumgewinnung entnehmen kann. Dies kommt in ein nicht mit Paraffin ausgekleidetes steriles Zentrifugenröhrchen. Man läßt das Röhrchen 1/2 Stunde lang kühl stehen, sticht dann mit einer ausgeglühten Platinnadel den Blutkuchen ab, zentrifugiert, pipettiert ab und verwahrt das Serum auf Eis.

Abbildung 33 1—6 zeigt nun, wie stark die Auswanderung in den 6 verschiedenen Medien ist. Nur in 5 und 6 haben sich die Fibroblasten der Milz entwickelt. Es sind also auf Figur 33 5 und 6 zwei Schichten sichtbar. Die leicht grau punktierten Schichten sind die ausgewanderten Lymphocyten und einige eosinophile Leukozyten der Milz auf allen Bildern.

Totalpräparate färbt man mit Giemsa oder auch Hämatoxylin und Sudan III. Es empfiehlt sich, auch Schnitte durch das eingepflanzte Stück zu machen.

B. Umbildung der Knochenmarkzellen.

Besonders lehrreich ist das Verhalten der Knochenmarkzellen im künstlichen Medium und zwar ist das rote, nur wenig Fett enthaltende Mark des jungen Huhnes zum Versuch besonders geeignet.

Die Methode des Ansetzens der Kulturen ist die gleiche wie bei der Milz, nur muß darauf geachtet werden, daß das Knochenmark direkt aus dem getöteten Tier in das Nährmedium ohne Ringerzusatz gebracht wird. Zu diesem Zwecke wird es sich empfehlen, das Knochenmark des Huhnes, welches wir für die fünfte Übung brauchen, auf folgende Weise zu gewinnen. Dem leicht narkotisierten Huhn wird mit einem scharfen Skalpell die Flügelhaut eingeritzt. Mit einer scharfen Knochenschere wird der Knochen in der Mitte durchgeschnitten, mit einer Hohlsonde das Knochenmark herausgenommen und sofort in das Kulturmedium gebracht. Man wähle sich ein junges Tier, dessen Knochen reichlich rotes Knochenmark enthalten, da das weiße Knochenmark durch seinen Fettgehalt kein gutes Beobachtungsobjekt bietet. Zuerst studiere man das Knochenmark in einem Tropfen Plasma, nachdem es ca. 1/2 Stunde im Thermostaten gewesen ist, damit man sich die vorhandenen Elemente des Knochenmarkes einprägt. Man kann lebend folgende Elemente unterscheiden (Abb. 34):

die Erythrozyten,
die Erythroblasten,
ungranulierte Zellen,
granulierte Zellen,
Riesenzellen;

Diese zerfallen sehr leicht, sind aber im Innern des eingepflanzten Stückchens auch später noch unverändert zu erkennen. Die Erythrozyten des Huhnes unterscheiden sich von den Erythroblasten durch das vorhandene Hämoglobin. Bei den Erythroblasten, deren Kern und Plasma rundlich ist, findet sich das Hämoglobin nur in Spuren. Die eosinophilen Leukozyten fallen durch ihre Granulierung auf. Beim Huhn sind sowohl stabförmige wie rundliche Granulationen vorhanden. Auch Fettzellen lassen sich lebend unterscheiden (Abb. 34).

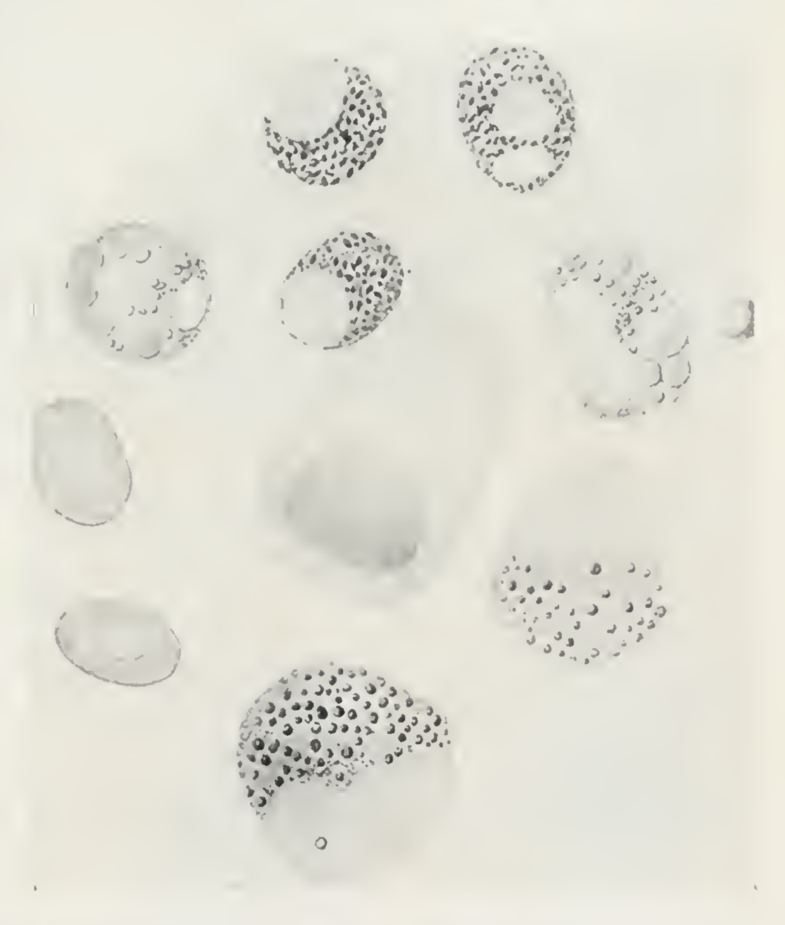


Abb. 34. Knochenmark des erwachsenen Huhns 1 Tag im Plasma gezüchtet. Ausgewanderte Zellen in dem Zellkranz. Oben drei eosinophile Leukozyten, einer in Teilung (Stäbchenform, unten 2 granulierte Formen. in der Mitte ungranulierte Form. Links und rechts oben 2 Fettzellen. Nach dem Leben, Original.

Die Schicksale dieser verschiedenen Zellarten im Plasmamedium sind folgende: Die eosinophilen Leukozyten wandern mit großer Schnelligkeit aus und teilen sich mehrmals hintereinander, so daß viele kleine Zellen entstehen. Diese verlieren sehr oft die Granula, der Kern wird pyknotisch und die Zellen sterben ab. Oder die Granula vergrößern sich, werden Degenerations - Granula ähnlich und färben sich dann sehr stark mit Neutralrot. Doch gehen auch diese Zellen, wenigstens beim Huhn, innerhalb von 5 Tagen zugrunde. Beim Meerschwein waren noch nach 10 Tagen eosinophile Leukozyten sichtbar. Ob diese nun aus den Vorstufen der Leukozyten in der Gewebekultur neugebildet worden sind oder ob es die überlebenden Leukozyten sind, bleibt zu entscheiden. Hat man das Knochenmarkstückchen nach einigen Tagen umgebettet, so erscheinen besonders viele kleine „Lymphozyten“ am Rande des eingebetteten Stückes, die sich dann mit ihren fingerartigen Fortsätzen langsam an die Peripherie des Mediums bewegen. Bei häufigem Umbetten wandern schließlich nur aus dem übrigbleibenden Retikulum diese kleinen „Lymphozyten“ aus. Sie sind stark basophil und haben bei Giemsafärbung einen vakuoligen Kern, der wenig mit Chromatin gefüllt ist. Der Protoplasmarand ist sehr oft zackig in der lebenden Zelle, nimmt natürlich ein glattes Aussehen im gefärbten Präparat an.

Ab und zu findet man auch noch Bindegewebszellen, die aus den Kapillargefäßen und aus dem Knochenmarknetzwerk stammen, sowie große Endothelzellen. Diese machen genau dieselben Veränderungen durch wie in der Milz und können auch stark phagozytieren. Die Riesenzellen, die mit dem Knochenmark eingepflanzt werden, sind oft am zweiten Tage noch erhalten. Ab und zu findet man bei jungen Tieren außerdem noch Knochenzellen, die lebend mit ihren vielen kleinen, stark lichtbrechenden Knochenspießen einen überraschenden Anblick gewähren.

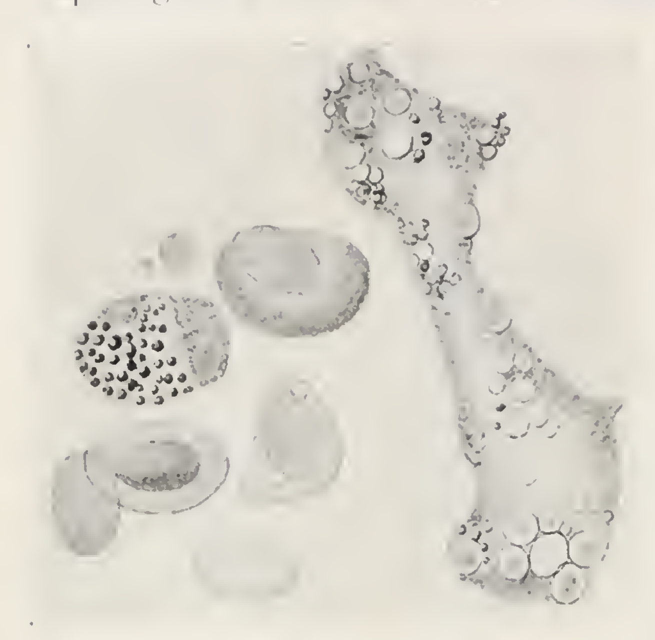


Abb. 35 wie 34, aber 2 Tage in Plasma gezüchtet. Beachte die wandernde Riesenzelle, die umgewandelte Fettzelle, das rote Blutkörperchen, das seinen Kern gerade ausstößt, darunter ein Lymphozyt mit Vakuolen um den Kern. Nach dem Leben, Original.

Das mikroskopische Bild wird beherrscht durch die abgebauten Fettzellen, falls man fettreiches Knochenmark genommen hat. Die Fettzelle oder Fettblase (Abb. 36) verliert das gespeicherte Fett (Abb. 36a), dieses löst sich schaumartig auf und färbt sich dann später auch nicht mit Osmium. Aus der alten Fettblase löst sich dann eine junge Fettzelle ab, die wieder unter Umständen Fett speichern kann, aber sich durch ihre Kleinheit von der Ursprungsfettzelle unterscheidet (Abb. 36b).

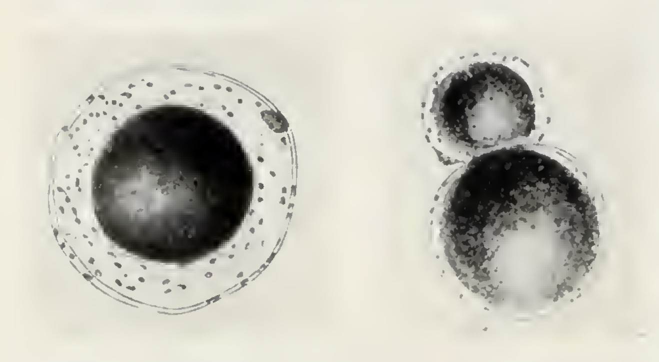


Abb. 36. Umgewandelte Fettzellen in der Gewebekultur. Nach Erdmann. Original.

Die Bilder 36, 36a u. 36b sind nach 48 Stunden Züchtung des Hühnerknochenmarks nach mit Osmium fixierten mit Safranin gefärbten Präparaten dargestellt.

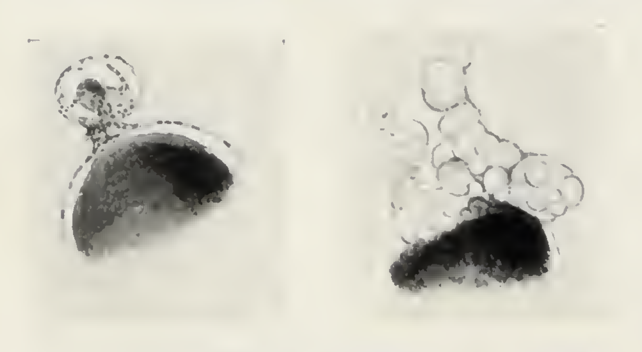


Abb. 36a. Umgewandelte Fettzellen in der Gewebekultur. Nach Erdmann. Original.



Abb. 36b. Umgewandelte Fettzellen in der Gewebekultur. Nach Erdmann. Original.

Diese geschilderten Veränderungen können lebend mit dem heizbaren Objekttisch beobachtet werden. Besonders auffallend ist die starke Beweglichkeit der Fettzelle, die mit ihrem Inhalt sich wie eine große Riesenzelle durch das Gesichtsfeld bewegt (Abb. 35). Leicht sind diese Zellen lebend durch die stark lichtbrechenden Fettkugeln

erkenntlich. Gefärbt fallen sie durch ihr schaumiges Aussehen auf. In der Gewebekultur findet also der Abbau des Fettes in freie Fettsäuren statt, eine Erscheinung, die sehr oft auch bei pathologischen Zuständen eintritt.

Man kann, wenn man rechtzeitig das Medium wechselt, die verschiedenen Zellarten getrennt auswandern sehen. Zuerst, wie gesagt, die eosinophilen Leukozyten, dann die Lymphozyten. Hier bietet sich also Gelegenheit, Experimente mit der gewünschten Zellart zu machen.

Das Knochenmark ist in den verschiedensten Medien vielfach untersucht worden, aber sehr häufig sind Auswanderung und echtes Wachstum gerade beim Studium des Knochenmarks verwechselt worden. Die einzigen Erscheinungen des echten Wachstums sind die Loslösung der kleinen „Lymphozyten", die histologisch den Polyblasten MAXIMOWS am nächsten stehen. Alle anderen Erscheinungen haben mit echtem quantitativen Wachstum nichts zu tun, selbst dann, wenn sich aus den Vorstufen der eosinophilen Leukozyten vollausgebildete Leukozyten in der Gewebekultur entwickeln.

C. Erscheinungen der Phagozytose und der Riesenzellbildung.

Kein geeigneteres Objekt gibt es, um die phagozytierende Tätigkeit der Zelle im Leben zu zeigen, als die Milz (7. Übung). Man nehme, wie schon beschrieben, Milz vom Huhn oder vom Menschen und züchte

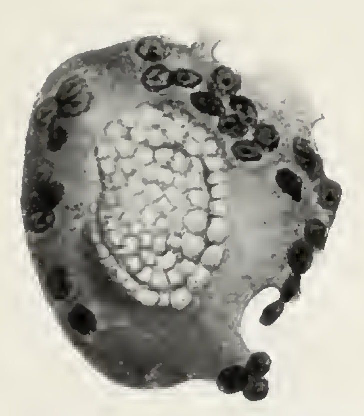


Abb. 37. Schnittbild einer vielkernigen Riesenzelle in welcher sich zahlreiche Lykopodiumsporen befinden. Nach LAMBERT, 1912. Journ. exp. Med., Band 15.

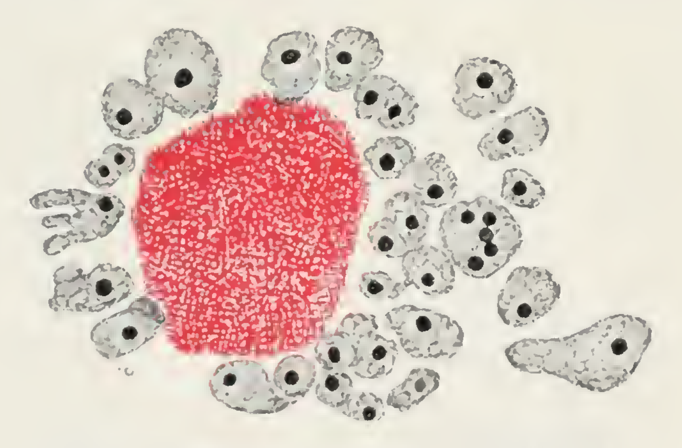
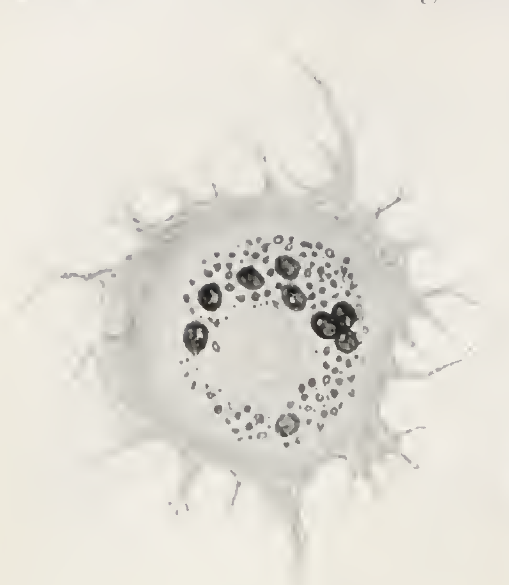


Abb. 38. Phagozyten umgeben einen Haufen von Tuberkelbazillen. Schnitt durch ein sieben Tage in Plasma gezüchtetes Gewebestück aus der Lunge eines tuberkulösen erwachsenen Kaninchens. Nach VERATTI, 1919. Nr. 1—2 Bollettino della Soc. Medic. Chir. di Pavia.

sie in einem beliebigen Medium, Hühnerplasma und Embryonalextrakt einerseits oder für den Menschen Menschenplasma und Hühnerplasma, dem man sterilisierte Lykopodiumsporen hinzugefügt hat. Es ist dabei zu beachten, daß die Lykopodiumsporen frei im Medium schwimmen und nicht, wie es mitunter getan worden ist, erst auf das Deckglas gebracht werden. Nach 1—2 Tagen sieht man verschiedene Stadien, die zur Bildung von Riesenzellen führen. Viele kleine Zellen umgeben eine einzelne Spore, manche Zellen haben sich zu einem großen Synzytium

zusammengeschlossen, in dessen Mitte 1 oder mehrere Sporen sich befinden. Es geht deutlich daraus hervor, daß diese Art von Riesenzellen sich aus vielen Zellen gebildet hat (Abb. 37).

Das gleiche läßt sich auch zeigen, wenn man in die Kultur am zweiten Tage der Züchtung vielleicht Tuberkelbazillen einfügt. Auch hier umgeben, wie Abb. 38 zeigt, die Zellen zuerst den Bakterienhaufen, der später aufgenommen wird. Es ist wichtig, daß man nicht gleich am ersten Tage, nachdem die Kulturen angesetzt sind, die Bazillen zufügt, weil frisches Plasma eine stark bakterizide Tätigkeit ausübt, und erst am zweiten Tage wird ein Gleichgewicht zwischen Plasma und Bakterien hergestellt. Die Bakterien selbst würden, wenn nicht Zellen in dem Plasma sich befänden, allein weitergedeihen. Die phagozytierenden Zellen aber nehmen die Bakterien auf und vernichten eine große Anzahl derselben (Abb. 40 und 41).



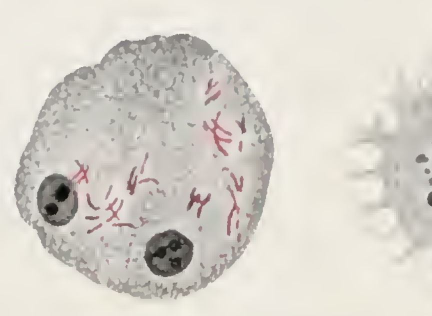


Abb. 39, 40. 41. Riesenzellen, vielkernige mit und ohne Tuberkelbazillen. Material wie auf Abb. 38 nach VERATTI, 1919.



Abb. 42. Mäusesarkomzelle, die große Karminteilchen aufgenommen hat. Vier größere sind über dem viereckigen Kern kenntlich. Beachte die Pseudopodien. Nach LAMBERT und HANES, 1911. Journ. exp. Med., Bd. 14. (Färbung mit Hämatoxylin, Totalpräparat.)

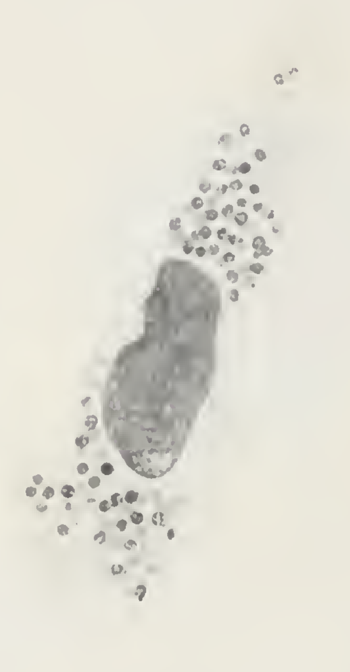


Abb. 43. Mäusesarkomzelle, aus dem gleichen Präparat, in welcher nur die sog. Degenerationsgranula nach längerer Züchtung sichtbar werden.

Außer Lykopodiumsporen lassen sich auch Karminteilchen oder japanische Tusche benutzen. Immer aber können diese aufgenommenen, von den später, — wie wir sehen werden in der Gewebezüchtung sich

bildenden Granulationskörner — gut unterschieden werden (Abb. 43). Die Tumorzellen zeigen dies deutlich. Sie sind zuerst auch benutzt worden, um die phagozytierende Tätigkeit der Zelle in vitro zu zeigen (Abb. 42).

Wenn die Endothelzellen der Milz und die Tumorzellen besonders gute Objekte darstellen, so kann man aber auch alle anderen Zellarten benutzen. Fast jede Mesenchymzelle kann Fremdkörper aufnehmen, daher wird bei der Deutung späterer Befunde dieses Moment stets in Rechnung gezogen werden müssen, denn nicht alle Einschlüsse in lang gezüchteten Zellen sind von der Zelle selbst gebildet, sondern Kerne, totes Zellplasma, tote Zellen aus der Kultur werden wahllos aufgenommen. Das Nahrungsbedürfnis der Zellen in der Gewebekultur ist sehr stark. Besondere Beachtung verdienen die Endothelzellen, die am schnellsten sich aus ihrer Umgebung befreien und am heftigsten phagozytieren. Diese Eigenschaft des retikulo-endothelialen Systems verdient besondere Beachtung, da sie ja nicht nur in der Gewebekultur, sondern auch bei vielen pathologischen Zuständen nachzuweisen ist.

D. Zellteilung der lebenden Zelle und Darstellung ihrer Inhaltskörper.

Für die 8. Übung werden Deckglaskulturen von Mesenchymzellen, sei es Huhn oder Meerschwein, die im Plasma oder LOCKE-LEWIS Lösung gezüchtet werden, verteilt, die in dem späteren Verlauf des Praktikums vom Kursisten selbst ausgeführt werden. Jetzt soll an ihnen das Lebendbeobachten und die Darstellung der Inhaltskörper der Zelle geübt werden. Wir heben die Kultur, nachdem wir sie uns bei mittlerer Vergrößerung angesehen und das eingepflanzte Stück und den neugebildeten Zellsaum unterschieden haben, mit der Kühnschen Pinzette vorsichtig ab und legen sie auf einen sterilen, flachen, auf 37,5 erwärmten Objektträger (Brutschrank) und umringen sie neu vorsichtig mit Vaselin. Der halbfeste Plasmatropfen oder die Kulturlösung hält bei richtigem Behandeln die Zellen in ihrer früheren Lage.

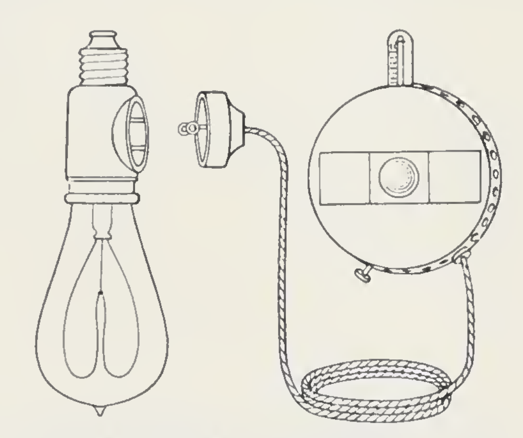


Abb. 44. Heizbarer Objekttisch, beim Durchmustern von Kulturen zu empfehlen.

Hat man die Mesenchymzellen (Abb. 45) vorsichtig auf einem flachen Objektträger unter Immersion eingestellt und sie entweder vermittels eines heizbaren Objekttisches (Abb. 44) oder, da dieser im allgemeinen nicht für jeden Schüler zu haben ist, auf einer Petrischale mit auf 38—40° C erwärmtem Wasser, das man häufig wechselt, gelegt, so lassen sich an der lebenden Zelle folgende Einzelheiten beobachten. Der gewöhnliche Ruhekern kann ohne jede Schwierigkeit erkannt werden, er ist homogen und stark durchscheinend. Sein Lichtbrechungsvermögen ist dem des

Zellplasmas ähnlich. Sehr oft kann der Kern nur durch die Anordnung der Mitochondrien und der Granula um ihn herum erkannt werden und durch das Vorhandensein der Nukleoli in ihm. Die beiden, den Binde-

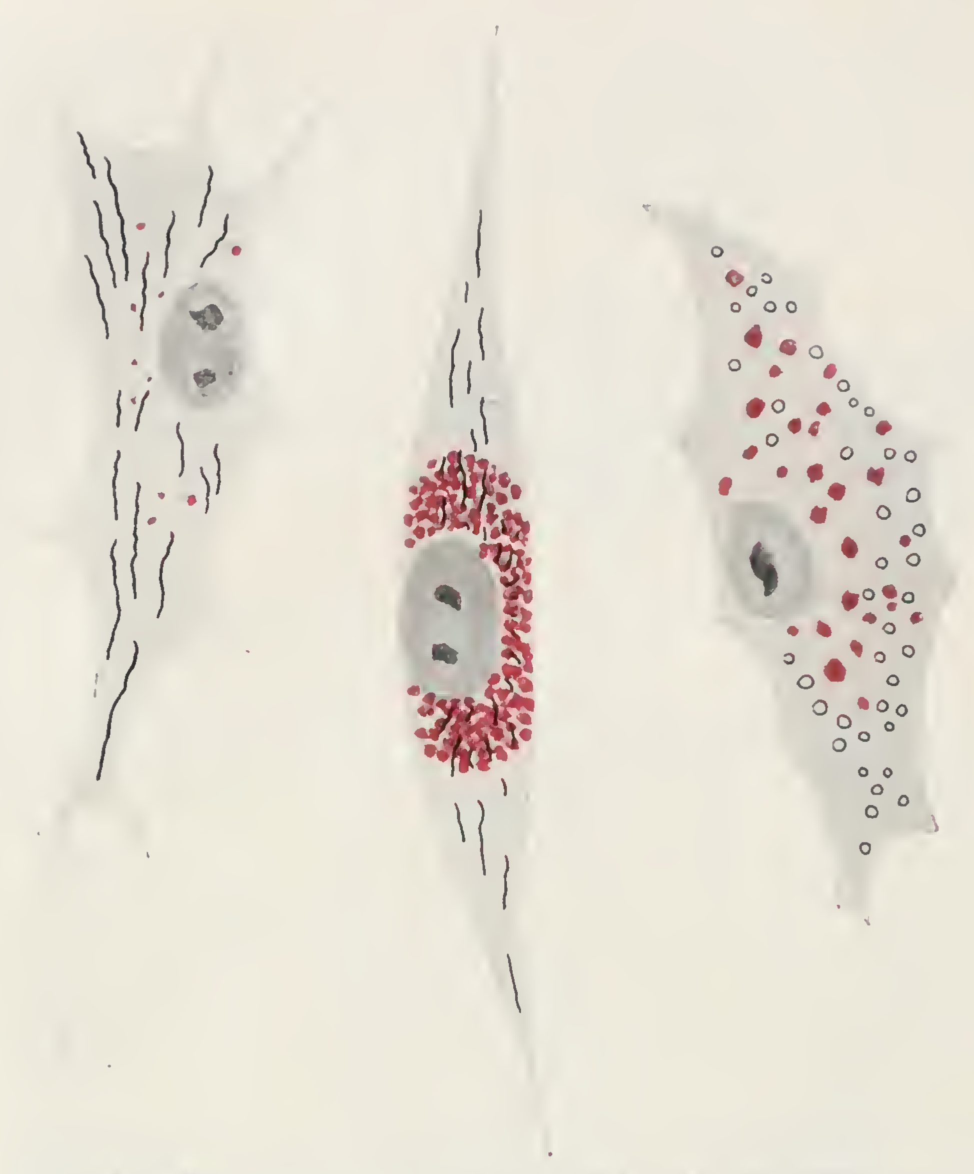


Abb. 45. Mesenchymzellen des Hühnerembryos in LOCKE-LEWIS-Lösung verschieden lang gezüchtet, vital gefärbt mit Neutralrot und Janusschwarz nach W. LEWIS, 1919. Johns Hopkins Bull., Bd. 30.

gewebszellen eigenen Nukleoli sind gut erkennbar. Sie haben eine unregelmäßige Außenstruktur und scheinen lebend zerklüftet. Ganz im Gegensatz zu dem gefärbten Präparat, in welchem der Nukleolus als runder, scharf umgrenzter Punkt erscheint. Keine Kernmembran ist in der lebenden Zelle erkenntlich. Trotzdem ist die Grenze zwischen Kern und Zellplasma in der Periode zwischen zwei Kernteilungen gut erkennbar. Während der Prophase geht der geschlossene Charakter des Kernes verloren und die Chromosomen sind als traubenförmige Gebilde erkenntlich. Auch die Spindel, aber nicht Spindelfasern lassen sich erkennen. Der Kernsaft ist allmählich verschwunden und das Zellplasma umringt jetzt die verdichtete Masse des Chromosomenmaterials. Es muß also nach Zellen mit solchen Kernformen gesucht werden. Im Zell-

teilungsvorgange die lebende Zelle zu studieren wird nur bei *langsamem* Studium gelingen. Doch lassen sich immer einzelne Stadien des Mitosenablaufs durch die eben geschilderte Methode aus der Masse der wachsenden Mesenchymzellen finden.

Das *Zellplasma* der lebenden Zelle ist selten homogen, fast immer mit Inhaltskörpern beladen. Das eigentliche Zellplasma, das gewöhnlich als halbflüssige Substanz angesehen wird, enthält verschiedenfache Einschlüsse, die lebend erkenntlich sind, die Mitochondrien und die Granula. Durch die von uns gewählten Zuchtbedingungen, also hier z. B. durch das Ansetzen der Mesenchymzellen in LOCKE-LEWIS-Lösung, die zu den sehr flüssigen Medien gerechnet werden muß, breiten sich die Zellen unter dem Deckglas aus. Man kann ein Endoplasma mit staubähnlichen Körnchen und ein fast homogenes Außenplasma erkennen. Es ist kein Zentriol als scharf umschriebener Körper in der lebenden Zelle vorhanden, sondern nur eine klare Zentrosphäre. Doch da ein so scharf und leicht erkenntlicher Körper wie das Zentriol im gefärbten Präparat erscheint, so müssen wir annehmen, daß das, was in der gefärbten Zelle als Zentriol erscheint, eine Verdichtungs- und Verdünnungszone des Zellplasmas lebend darstellt.

Die *Mitochondrien* (Abb. 45) haben wechselnde Gestalt. Gewöhnlich sind sie lang und fadenartig und mitunter verzweigt. In älteren Kulturen wachsen die Stäbchen zu kleinen Bröckchen, die sich abrunden können. In degenerierenden Kulturen häufen sie sich um die Zentrosphäre. Chemisch bestehen sie jedenfalls aus Phospholipin und Albumin. Ihre wirkliche Bedeutung im Zellhaushalt ist bis jetzt noch nicht geklärt. Manche Forscher glauben, daß sie mit den Zellfunktionen, wie Atmung, Assimilation, Speicherung von Nähr- und Abbaumaterial zusammenhängen. Andere schreiben ihnen die Bildung von Neuro- und Myofibrillen oder auch elastischen Fasern zu. Durch Färbung mit Janusgrün und Janusschwarz sind sie lebend nachweisbar.

Die Granula erscheinen im Laufe der Züchtung in größerer Masse und werden bei Neutralrot-, Methylenblau (EHRLICH)- und Brillant-Kresyl-Färbung so kräftig getönt, daß sie in der lebenden Zelle erkenntlich sind. *Diese Granula sind nicht lebende Substanz.* Ihr Inhalt kann wieder abgebaut werden und vielleicht als Nährmaterial der Zelle während des Aufenthaltes im Züchtungsmedium verwandt werden. Noch andere Autoren halten sie nur für Ansammlungen von Degenerationsprodukten, wiederum andere für Körnchen, die aus Eiweiß und Fett zusammengesetzt sind. Auch ihre chemische Struktur harrt noch der Aufklärung. Wenn man tote Zellen färben will, werden diese Körner allein nicht tingiert. Wahrscheinlich läßt das Zellplasma die Farbe nicht durch.

Totalfärbung: Die Mesenchymzellen sind an dem ersten Tage der Züchtung nur mit wenigen sich mit Neutralrot färbenden Körnchen erfüllt (Abb. 45). Vom zweiten Tage an erscheinen die stark lichtbrechenden Granula reichlich, die sich mit den Mitochondrien in der Zelle bewegen. Diese Körnchen sind von vielen Autoren als Degenerationsgranula angesehen worden. Mikrochemisch sind sie durch

folgende Reaktionen gekennzeichnet: Sie nehmen elektiv Neutralrot in der Verdünnung von 1 : 80 000 in Ringer-Lösung oder Locke-Lewis-Lösung auf. Je älter die Kulturen werden, desto stärker vermehren sich die Granulationen und können später ganz die Zelle erfüllen. Außer diesen sogenannten Degenerationsgranula sind, wie schon gesagt, in den Mesenchymzellen auch Mitochondrien, die sich mit Janusgrün oder Janusschwarz in Verdünnung 1 : 40 000 färben. Beide Färbungen können als Kursübungen leicht nachgeprüft werden, nur muß man geeignete gute Vitalfarben anwenden, die man genau ausprobieren muß, wie lange und eventuell wie stark verdünnt man sie am besten anwendet. Man färbt erst ein Präparat mit Neutralrot, ein anderes mit Janusgrün oder Janusschwarz, hierauf ein drittes Präparat mit beiden Lösungen hintereinander. Man bringt das Deckglas mit den in dem Medium liegenden Gewebestück auf einen flachen



Abb. 46. Teilung der Fibroblasten des embryonalen Huhnes, von 8^{35} – 10^{50} beobachtet. Nach LEVI, 1919. Arch. ital. Anat. Embriol., Bd. 15.

Objektträger, so, daß das Material nach oben liegt und saugt mittels einer Kapillarpipette das Medium vorsichtig ab. Hierauf beschickt man das Gewebestück mit einem Tropfen der oben erwähnten Farblösungen und läßt die Vitalfarben einen Augenblick auf das Gewebe einwirken. Nun wird das Deckglas umgedreht auf den Objektträger gelegt, mit Vaselin geringt und das gefärbte Gewebe mittels Ölimmersion betrachtet. Ist die Färbung etwas schwach, so kann man nachträglich mit der Kapillare noch etwas Farblösung vorsichtig unterfließen lassen.

In doppelt gefärbten Präparaten zeigt sich folgende Tönung: Die Degenerationsgranula sind rot, die Mitochondrien sind dunkelgrün oder schwarz. Später, nach 3 – 4 Tagen, finden sich in diesen Zellen sehr viele Vakuolen. Man nimmt an, daß die Degenerationsgranula wieder abgebaut werden, um der Zelle als Nahrung zu dienen. Der Vakuolenreichtum absterbender Zellen ist erstaunlich, von Plasma ist wenig mehr in der Zelle zu bemerken (Abb. 45).

Die Zellteilung: Die wichtigste Lebensäußerung der Zelle in der Gewebekultur ist ihre Befähigung, sich entweder mitotisch oder amitotisch zu teilen. Wir wählen wieder als besonders günstiges Objekt, um die Teilung zu studieren, die in LOCKE-LEWIS oder Plasma gezüchtete Mesenchymzelle des Huhnes und können bei den flach unter das Deckglas ausgebreiteten, langgestreckten Zellen die Kernstrukturen leicht erkennen. In dieser 9. Übung wird die Teilung einer lebenden Zelle verfolgt. Wir haben hier einige Abbildungen von LEVI (Abb. 46), der beim gleichen Material mit außerordentlicher Sorgfalt die Zellteilung beobachtet hat, wiedergegeben. Die Bildung der Kernschleifen, das Einstellen der Chromosomen in die Kernteilungsfigur, das Auseinanderrücken der Chromosomen läßt sich gut beobachten. In 36 Minuten ist die Bildung der Tochterkerne und ihr Auseinanderrücken erfolgt. Am interessantesten aber ist die nun folgende Zellplasmateilung in 99 Minuten. Die Zellen haben sich während des mitotischen Vorganges abgerundet und haben kleine Fortsätze gebildet. Diese Fortsätze ziehen aus der Zellkugel mit ihren beiden neugebildeten Kernen zwei unregelmäßige Kugelhälften nach zwei verschiedenen Seiten auseinander. Diese Kugelhälften runden sich erst ab und formen sich später zu einer flachen, kubischen Zelle. Später streckt sich diese kubische Zelle und bekommt die der Mesenchymzelle eigne, langgestreckte Ausgangsform. Ist das Medium zu flüssig, so kann keine Zellteilung erfolgen.



Abb. 47. Rattensarkomzellen in lebhafter Wanderung. Abenteuerliche Pseudopodienbildung. Anhäufung von „Degenerations"körnern in der Zelle. Körnchenströmung. Nach LAMBERT und HANES, 1911, Journ. exp. Med. Bd. 14.

Hat man Sarkomzellen irgendwelcher Herkunft vorrätig, so kann man die Strömung der Degenerationskörner in der Zelle, das schnelle Wandern der Sarkomzellen im Präparat, die fortwährende Pseudopodienbildung leicht beobachten (Abb. 47).

E. Erscheinungen des Zelltodes.

Die 10. Übung wird sich mit der Frage befassen, wie äußern sich die Absterbeerscheinungen der Zelle in der Kultur. Kulturen

von Mesenchymzellen, die erst kurze Zeit wachsen, sind in allen Einzelheiten bekannt; wir legen eine solche Kultur von wachsenden Hühnermesenchymzellen mit dem Deckglas auf einen flachen Objektträger und beobachten sie auf einem heizbaren Objekttisch. Jetzt stellen wir mit der Immersion eine geeignete Zelle ein. Dann führt man mit einer feinen Kapillare eine Lösung von Kaliumpermanganat 1 : 40 000 bis 1 : 80 000 unter das Deckglas, saugt die überschüssige Lösung ab und ringt das Präparat mit Vaselin wieder ein. KM_nO_4 gibt an das Protoplasma freien Sauerstoff ab.



Abb. 48, 1—11. Eine 48 Stunden alte Kultur von Hühnermesenchymzellen von dem Bein eines 7 Tage alten Hühnerembryos. Mit Kaliumperganat behandelt und 16 Minuten darauf fixiert in ZENKERscher Lösung und gefärbt mit Eisenhämatoxylin - Eosin. Nach W. LEWIS, 1921. Am. Journ. of Anat., Bd. 28.

Nun lassen sich Erscheinungen des Zelltodes im Zeitraum von $^1/_2$ Stunde schrittweise verfolgen.

Das Chromatin des Kernes konzentriert sich im Kern (Abb. 48). das Volumen des Kernes verkleinert sich und rings um den Kern sind kleine Vakuolen sichtbar (Abb. 48, 4, 7, 10). Da Kaliumpermanganat chromatin kondensierend wirkt und man auch in den Vorstadien, welche der Zellteilung vorangehen, eine solche Konzentrierung des Kerninhaltes und Wasserabgabe findet, so geht man wohl nicht zu weit, wenn man annimmt, daß auch der Sauerstoffreichtum einen Anstoß zur Kernteilung bildet. Auch jetzt kann man Kernteilung beobachten (Abb. 48, 1, 2, 3).

In der mit Kaliumpermanganat behandelten Kultur folgen nun weiter Absterbeerscheinungen in der Zelle selbst, die sich mit zahlreichen Vakuolen füllt und ganz besonders da, wo in der gefärbten Zelle das Zentriol sich befindet, einen eigenartigen homogenen Hof bildet. Auch die Degenerationskörner und Mitochondrien gehen allmählich unter Vakuolisierung und Verklumpung zugrunde, so daß schließlich nur eine strukturlose Masse übrigbleibt, die früher lebende Zellen vorstellte.

(Abb. 49, 12, 13, 14, 15). Alle diese Vorgänge lassen sich lebend gut beobachten, aber auch das gefärbte Präparat zeigt, wenn es schon behandelt ist, diese Veränderungen. Langsamer gehen nun die Absterbeerscheinungen in nicht mit Kaliumpermanganat behandelten Zellen vor sich, die sich selbst überlassen werden und deren Medium nicht gewechselt wird.

In den in vitro gezüchteten Mesenchymzellen des Hühnerembryos treten bei der Degeneration Vakuolen und Körner auf, die sich um das Zentriol anhäufen, das an einer Seite oder einem Ende des Kerns liegt. Parallel mit der Anhäufung der Körner entwickelt sich ein wachsender, heller Hof um das Zentriol, die Zentrosphäre. Sie wird größer als der Kern. Die Mitochondrien liegen gewöhnlich mehr oder weniger radial um das Zentriol und die Zentrosphäre, teils im Zytoplasma zwischen den Degenerationskörnern und -vakuolen, teils in der klaren peripheren Zone, in der es keine Degenerationskörner gibt. Bei der Kultur von Zellen derselben Körperstelle treten abwechselnd zwei Typen des Zellabbaues auf: 1. Der vakuoläre Typ, entweder mit umfangreicher Vakuolisation um die Zentrosphäre, die allmählich das ganze Zellplasma verdrängt, oder verbreiteter Sphäre, die gewöhnlich nicht scharf umrandet ist und mit radialer Anordnung der Mitochondrien um die Sphäre herum; 2. der Riesensphärentypus mit geringer Vakuolisation um die Sphäre, mit verbreiteter Zentrosphäre, die scharf umrandet ist und Zentriol, Mark- und Rindenzone erkennen läßt, oder mit konzentrischer oder radialer Anordnung der Mitochondrien um die Sphäre herum. Stets finden sich ein oder zwei Körnchen, Zentriolen in der Sphäre: die Mark- und Rindenschicht aber, die meist aus Degenerationsprodukten bestehen, sind mehr zufällige Gebilde. Strahlungen sind weder im lebenden noch im fixierten Präparat zu sehen, auch nicht in der sich teilenden Zelle. Bei dem vakuolären Zelltypus ist das zytoplasmatische Netzwerk, das sich von der Sphäre aus verbreitet, von halbfester Beschaffenheit und verbindet die halbfeste Sphäre mit einer mehr oder weniger dichten peripheren Lage. Die Vakuolen und Granula liegen in dem flüssigeren Teil des Plasmas, in dem sie durch Strömungen hin und her getrieben werden. Die Mitochondrien sind radiär angeordnet und liegen im festeren



Abb. 49, 12—15. Wie Bild 48. Die Absterbeerscheinungen mehren sich. Die Mitochondrien und Granula werden unkenntlich.

Netzwerk. In Zellen mit verbreiteter Sphäre zeigt sich kein intervakuoläres Netzwerk, aber gewöhnlich ist um die Sphäre ein sich färbendes Zytoplasma gelegen, indem Mitochondrien, Granula und Vakuolen liegen. In normalen Mesenchymzellen findet man nach 20 bis 24stündiger Kultur 1—2 Zentriolen meist an der einen Seite des Kerns oder an seinem Ende, häufig in einer Einbuchtung. Die Mitochondrien sind nicht radiär angeordnet, lang, fadenförmig, oft gegabelt und ohne Beziehungen zum Zentriol. Nicht in allen Kulturen sieht man die Vergrößerung der Zentrosphären; aber ihr Erscheinen kennzeichnet doch eine sog. „alte Kultur".

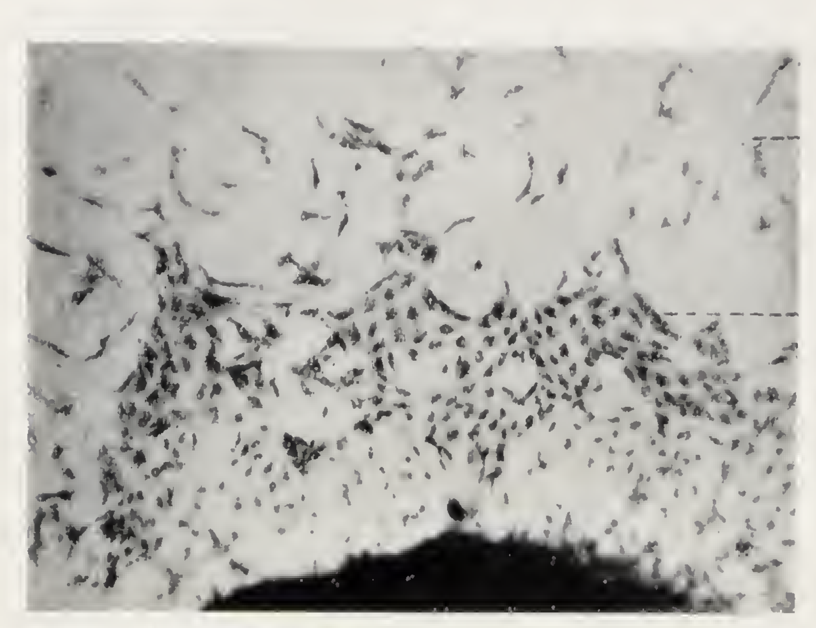


Abb. 50. Mesenchymales Gewebe aus dem Herzen eines 7 tägigen Hühnerembryos in normaler LOCKE-LEWIS-Lösung (nach HOGUE, 1919. Journ. exp. Med., Bd. 30).

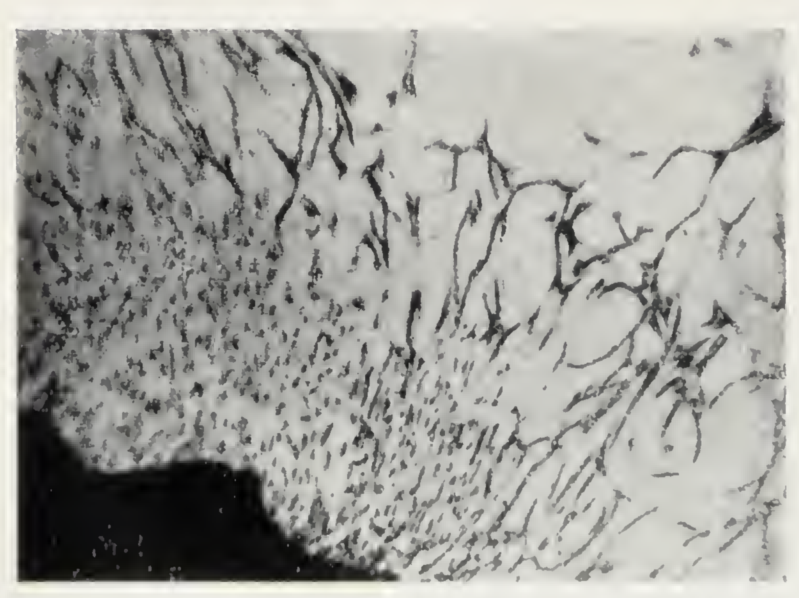


Abb. 51. Das gleiche Gewebe, aber in hypotonischer Lösung 3 Tage gezüchtet. Um das Explantat herum sind die Zellen gestorben (nach HOGUE wie Bild 50).

Ebenso interessante Beobachtungen kann man mit Zuchtversuchen von hypertonischen und hypotonischen Lösungen anstellen (11. Übung). Man bereite sich aus LOCKE-LEWIS-Lösung eine hypertonische und eine hypotonische Lösung. Die Zuchtlösung besteht aus 15 ccm Bouillon, 0,25 mg Dextrose, zu 85 ccm von LOCKE-LEWIS-Lösung. Von dieser Stammlösung wird ein bestimmtes Volumen durch Kochen bis $^1/_2$ oder $^1/_4$ des Volumens eingedampft, die hypotonische Lösung aber hergestellt, indem man die Stammlösung mit destilliertem Wasser versetzt. Der Gehalt an Kochsalz werde nun an beiden abgeänderten Lösungen berechnet. Da Hühnerbouillon praktisch denselben Kochsalzgehalt hat, wie LOCKE-LEWIS-Lösung, so brauchten keine Extraberechnungen

hierfür angestellt zu werden. Man setzt nun drei verschiedene Kulturreihen von embryonalem Hühnerherzen entweder 6, 7, 8 oder 9 Tage alt an, indem man $^1/_3$ der Kulturen in normaler LOCKE-LEWIS-Lösung mit Hühnerbouillon, $^1/_3$ in hypertonischer, $^1/_3$ in hypotonischer Lösung vorbereitet. Diese werden nacheinander verteilt.

Das Aussehen der Zellen in normalen Kulturen ist bekannt (Bild 50). Es ist wichtig, zu beachten, daß in ihnen gewöhnlich nach 48 Stunden die am weitesten ausgewanderten Zellen zuerst sterben, und daß in der Nähe des eingepflanzten Stückes die Zellen am längsten leben. Gerade das entgegengesetzte findet sich in hypotonischen Lösungen. Es sterben zuerst die Zellen um das Explantat, auch ist die Auswanderung in hypotonischen Lösungen langsamer als in normaler Lösung, da das Nährmedium nicht konzentriert genug ist. Macht man die hypertonische Lösung sehr stark, so daß sie 1,8% Kochsalz enthält, so sterben alle Zellen, nimmt man aber geringere Konzentration, wie z. B. 1,5 und 1,2%, so zeigten die einzelnen Zellen eigenartige Veränderungen. Sie bildeten fadenartige Fortsätze, die Mitochondrien verschwinden und das Zytoplasma zieht sich zusammen. Wenn man die Zellen mit Neutralrot und Janusschwarz vorfärbt, so kann man sehen, daß die Mitochondrien verschwinden, sowie die Zelle stirbt. Im Verlauf des Absterbeprozesses wird sie kleiner.

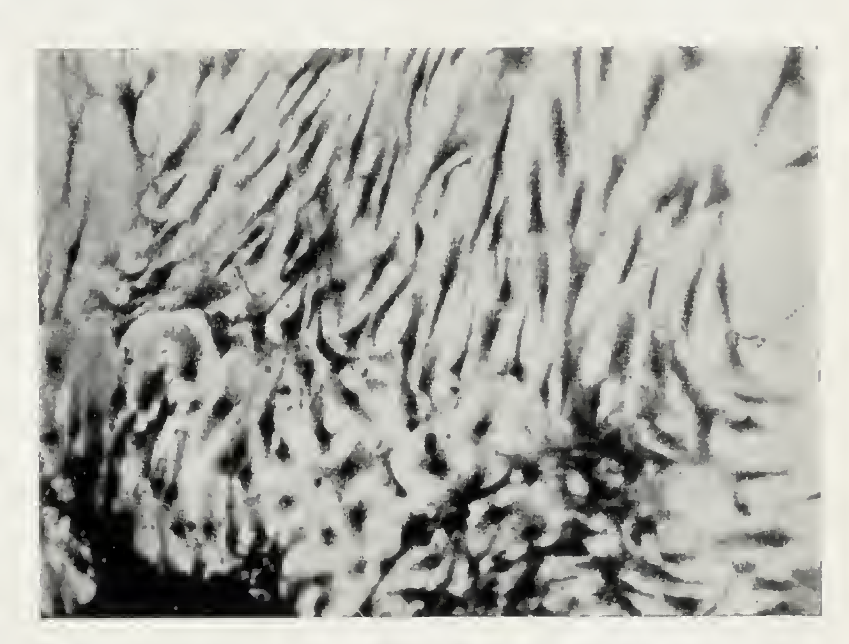


Abb. 52. Das gleiche Gewebe, das nach 48 Stunden Wachstum in normaler Lösung mit hypotonischer Lösung ausgewaschen wurde und dann wieder 24 Stunden in normaler LOCKE-LEWIS-Lösung weiter gezüchtet wurde. Die neugebildeten Zellen aus dem eingepflanzten Gewebestück überwachsen die zuerst ausgewanderten abgestorbenen Zellen.

In der hypotonischen Lösung hat im allgemeinen die Kultur ein verringertes Wachstum bis zu ihrem Tode, da die Nährstoffe weniger konzentriert sind. Doch müssen die Zellen weiter hinaus wandern, um Nahrung zu erlangen. Infolgedessen werden mehr Abbauprodukte in das Medium ausgeschwemmt. So ändert sich das Medium und viele Zellen sterben. Die einzelnen Zellen bilden in hypotonischen Lösungen große Vakuolen, besonders um den Kern herum. Das Zellplasma nimmt sehr viel Wasser auf und teilt sich in einen Granula enthaltenden und einen homogenen Teil. Der Kern ist stark vergrößert. Bei Färbung mit Neutralrot sind hier und da noch Neutralrotkörner sichtbar. Noch besser der Beobachtung zugänglich sind die Kulturen, wenn man sie erst in normale LOCKE-LEWIS-Lösung setzt und nach

24 Stunden diese absaugt und entweder hyper- oder hypotonische Lösungen hinzufügt (Abb. 52). Unter Immersion lassen sich alle diese Vorgänge in der lebenden Zelle verfolgen.

In diesem zweiten Teil unserer Einführung haben wir uns überzeugt, daß die Zellen in der Gewebekultur die Lebensäußerungen zeigen, die wir lebenden Zellen im allgemeinen zuerkennen, wir sahen die Zellen sich teilen, phagozytieren, sich fortbewegen, wir beobachteten in der Zelle das Spiel der wandernden Mitochondrien und Granula, die Vakuolenbildung und das Auftreten von Strukturen, die wir fast immer nur im gefärbten, selten im lebenden Präparat gesehen, wie Kernkörperchen, Teilungsspindel und Chromosomen. Ohne Mühe können wir die so vernachlässigte Lebendbeobachtung in dem isotonischen, vollständig klaren Plasmamedium pflegen. Ein wichtiger Fortschritt, der weiter verfolgt werden sollte.

III. Äußerungen echten Wachstums.

A. Echte Wachstumerscheinungen des embryonalen Bindegewebes und Ab- und Umbau des erwachsenen Bindegewebes.

Im Laufe unserer Betrachtungen haben wir die verschiedensten Zuchtmedien kennengelernt, die fast alle empirisch gefunden sind, wie z. B. die Froschlymphe für das Nervengewebe von Harrison. Mit der Weiterentwicklung der Methodik der Gewebezüchtung aber wurde der Zusammensetzung des Mediums mehr und mehr Bedeutung zugemessen und planmäßige Untersuchungen angestellt, welche Eigenschaften für das Wachstum oder auch die Differenzierung von Zellen ein Medium haben muß, um allen Anforderungen zu genügen. Von Carrel ist nachgewiesen, daß, je jünger das Tier, aus dessen Blut Plasma gemacht wird, ist, desto besser die Mesenchymzelle wachsen kann. Weiter steht fest, daß über Jahre dauerndes Leben von Mesenchymzellen nur in einem Medium möglich ist, in welchem sich Plasma eines jungen Tieres oder Embryonalextrakt befindet. Es ist also wohl sicher, daß Wachstumshormone oder Wachstumsenzyme in den Körpersäften dieser Tiere kreisen. Ringersche Lösung, Locke-Lewissche Lösung, Liesegangs kolloidale Lösungen erlauben ein bis zu 14 Tagen andauerndes Wachstum embryonaler Warmblütler- und erwachsener Kaltblütler-Zellen bei häufigem Wechsel des Mediums. Dies zeigt, daß in den erwachsenen Zellen selbst der Kaltblütler, wie es ja bei der embryonalen Zelle allgemein angenommen wird, Wachstumsbeschleuniger sich befinden, die im Laufe der Zeit aufgebraucht werden.

Der Ab- und Umbau der erwachsenen Warmblütler-Zelle ist bis jetzt nur im Plasmamedium beobachtet worden und besonders günstig scheint für die Aktivierung der Zelle ein Waschen in arteignem Serum bei täglichem Wechsel des Plasmas nach Champy.

Ganz grob gesprochen, stellen wir uns jetzt die Aufgabe, wie gelangen wir in den Besitz einer Gewebe-„Kultur" im wahrsten Sinne des Wortes, eines Aggregats von Metazoenzellen, die nicht von uns in das Medium gesetzt wurden. Weiter müssen wir diese neugebildeten Zellen beliebig oft zum Ansetzen von Tochter-, Enkel- und Generationenfolgen n^{ter} Potenz benutzen können (12. Übung).

Diese Forderung ist bis jetzt nur bei der Züchtung von Mesenchymzellen des embryonalen Hühnerherzens erfüllt, aber hier auch vollkommen einwandfrei. Doch ist von Fischer 1922 zuerst eine dreimonatliche Züchtung von Lidepithel berichtet.

Die bis jetzt angestellten Untersuchungen haben die Erscheinungen des Zellebens in mannigfacher Verschiedenheit uns klar gemacht, doch können noch immer nicht die Erscheinungen des echten, also quantitativen Wachstums der Zellen von den Praktikanten an selbst angefertigten Präparaten studiert werden. Wir haben im Laufe des Kurses zur Beobachtung der lebenden Zelle bei Einübung der Vitalfärbung und weiter bei Beobachtung der Zellteilung Präparate von Mesenchymzellen ausgeteilt, die frisch in dem Medium gewachsen waren. Es war leicht, an ihnen die neugebildeten Zellen von dem eingepflanzten Stück zu unterscheiden. Schwieriger aber ist es, ein solch beweisendes Präparat nun selbst anzufertigen.

Wir werden jetzt das über Wochen ausgedehnte Wachstum der embryonalen Bindegewebszelle studieren und zum Gegensatz oder Vergleich der Erscheinungen der erwachsenen Bindegewebszelle in der Gewebekultur heranziehen. Zum Studium der embryonalen wachsenden Bindegewebszelle wird gewöhnlich die Mesenchymzelle genommen, die aus dem embryonalen Herzen der Maus, der Ratte oder des Huhnes herauswächst. Es ist von Vorteil, wenn der benutzte Embryo nicht mehr als ein Drittel seiner Entwicklungszeit durchgemacht hat, das Huhn also, welches wir als Objekt wählen, nicht mehr als 7 Tage alt ist. Vor der Arbeit muß Hühnerplasma, Ringerlösung und Embryonalextrakt vom Huhn bereit sein, reichlicher Vorrat von allen diesen Medien ist eine Hauptbedingung. Das Ei wird an seinem stumpfen Pol geöffnet. Man benutzt eine Knopfschere. Die Polkappe der Eischale, unter welcher sich die Luftkammer befindet, wird abgeschnitten. Vorsichtig läßt man nun den Inhalt des Eies in eine bereitstehende flache, sterile Schale laufen. Hierbei ist zu beachten, daß der Embryo oben auf dem Dotter ausgebreitet liegt. Jetzt hebt man mit einer Pinzette und einem Spatel den Embryo in eine frische, kleinere sterile Schale, indem man mit der Pinzette den Embryo vorsichtig anfaßt und mit dem Spatel den Embryo stützt, damit er nicht zerfließt. Der Embryo ist gallertartig, deshalb ist Vorsicht beim Herausheben nötig. Die nun zum Abspülen benutzte Ringersche Lösung ist auf 37° C angewärmt. In eine sterile Schale bringt man ein steriles feuchtes Gazeläppchen und breitet vorsichtig den Embryo darauf aus, wenn der Embryo so klein ist, daß man nicht ohne Lupe auskommen kann. Ist der Embryo größer, so nimmt man die Organe, die man züchten will, hier also das Herz, einfach heraus und legt es in eine sterile Schale. Je weniger

man die Organe mit Instrumenten anfaßt, desto besser, Schnelligkeit ist hier erste Bedingung. Das Herz wird zerstückelt und wie bei den anderen Übungen entweder mit reinem Plasma, mit RINGERscher Lösung und Plasma, mit Embryonalextrakt und Plasma oder in Ermangelung von allen diesen Medien mit LOCKE-LEWISscher Lösung beschickt. Es ist ganz besonders bei Warmblütlern darauf zu achten, daß zugleich mit den im Medium befindlichen embryonalen Gewebestückchen auch Deckgläser mit je einem Tropfen der verschiedenen angewandten Medien ohne Material in den Brutofen gebracht werden, damit man bei etwaigen Verunreinigungen die Quelle der Infektion sicher kennt und sie bei weiteren Versuchen ausschalten kann. Manche Forscher empfehlen, das Gewebestück zuerst auf das Deckglas zu bringen und dann den Plasmatropfen, andere dagegen beschicken erst mit Plasma und legen dann das Gewebestück hinein (CHAMPY). CHAMPY meint, daß der Embryo auf diese Weise besser Sauerstoff aus der Luft aufnehmen kann. Nach kurzer Zeit, gewöhnlich nach 24—48 Stunden, breitet sich ein schleierartiger Ring um das eingepflanzte Stück aus. Dieser schleierartige Ring besteht zum großen Teil aus Mesenchymzellen (Abb. 53), die oft ein vakuoliges Aussehen haben. Sie können die abenteuerlichsten Formen annehmen, haben einen blasigen, fast homogenen Kern und verzweigte spitze Ausläufer.

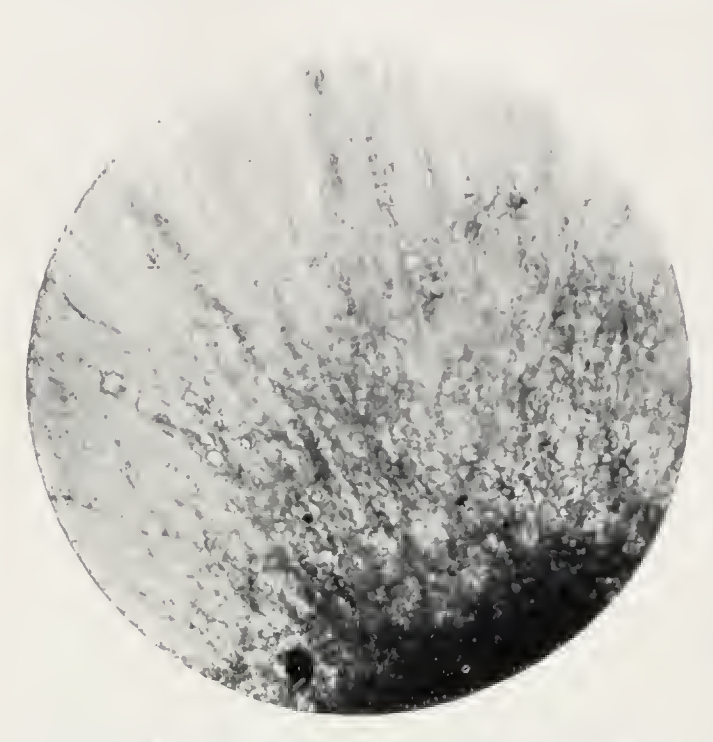


Abb. 53. Mesenchymzellen des Unterhautbindegewebes vom 13 täg'gen Hühnerembryo. 8 Tage in Plasma gezüchtet. Mikrophotogramm nach dem Leben. Das dunkle Stück unten ist das eingepflanzte, allmählich nekrotisch werdende Gewebe. (Original nach ERDMANN.)

Schneidet man nun ein Stück dieses Hofes oder Schleiers aus und bringt ihn in neues Medium, so ist man ganz sicher, daß man Mesenchymzellen fast rein bekommt, nachdem die Blut- und Muskelzellen des embryonalen Herzens nicht mit übertragen worden sind.

Nur auf diese Weise ist es möglich, die Gewebekulturen über längere Zeit am Leben zu erhalten, denn die nekrotischen alten Zellen müssen früher oder später entfernt werden. Auf diese Weise ist es CARREL und EBELING gelungen, Gewebe in 358 Passagen durch 18 Monate am Leben zu erhalten unter guten Wachstumsbedingungen. Im Jahre 1914 wurde die Wachstumsgeschwindigkeit dieses Gewebes, das schon 2 Jahre unter Kulturbedingungen gewesen war, geprüft und es fand sich, daß, verglichen mit einem neu eingepflanzten Stück embryo-

nalen Hühnerherzens, das solange in Kultur gewesene Herz schneller sich fortpflanzte, einen größeren Ring von Zellen erzeugte, wie ein frisch in Kultur genommenes Stück. Die Abkömmlinge dieser Zellen leben noch heute, es sind bis April 1919 1347 Passagen gemacht worden. Das Merkwürdige dabei ist, daß sich die Zellen bis jetzt nicht differenziert haben, sondern Mesenchymzellen, Vorstufen von späterem Bindegewebe, Knorpel, Knochen- oder Muskelzellen sind.



Abb. 54. Gefärbtes Präparat der 732. Passage (April 1917). Abkömmlinge der am 17. Jan. 1912 eingepflanzten Mesenchymzellen des embryonalen Hühnerherzens in einem Medium von Hühnerplasma und Embryonalextrakt wie 1 : 1. (Nach EBELING, 1919, Journ. exp. Med., Bd. 30.)

Um quantitatives Wachstum wirklich einwandfrei nachzuweisen, verfahren wir folgendermaßen: Nachdem wir uns Kulturen angelegt haben, zeichnen wir uns mit einem Zeichenapparat die Umrisse von innen und messen die beiden größten Durchmesser mit einem Okularmikrometer. Unter jede Kultur legt man direkt in die Schale diese Zeichnung und seriert sowohl die Kulturen als auch die Zeichnungen. Am besten läßt man jetzt die Präparate 24—48 Stunden ruhig im Brutofen stehen und kontrolliert dann den ausgewachsenen Zellenhof, der außer Mesenchymzellen für gewöhnlich noch embryonale Blutzellen und mitunter Myoblasten enthält. Jetzt fertigt man sich von einem Präparat wieder eine Zeichnung an, läßt aber ein Präparat vollständig

ungestört stehen. Vom 3. Präparat schneidet man sich in jetzt zu besprechender Weise den Zellenhof ab und pflanzt ihn in gleiches, neues Medium (13. Übung).

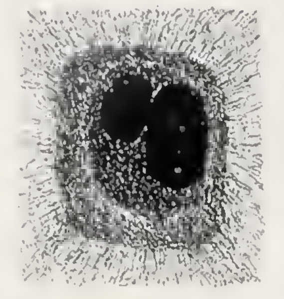


Abb. 55. Ausschnitt aus gewachsenen Mesenchymzellen des embryonalen Hühnerherzens 1 Stunde nach der Überpflanzung. Die Zellen waren 28 Monate gezüchtet. Nach CARREL 1914. Journ. exp. Medizin, Band 20.

Das Abschneiden des neugewachsenen Zellhofes erfordert eine gewisse Übung (Abb. 55). Den heizbaren Objekttisch legt man auf den Tisch der binokularen Lupe, setzt sich seine frisch geschliffenen Instrumente zurecht, hat aufgelöstes Vaselin, aufgelöstes Medium, sterile Objektträger und Deckgläser in Greifnähe. Jetzt dreht man genau so, als ob man die Präparate mit frischem Nährmedium versehen wollte, das Deckgläschen um, entfernt die alte Kulturflüssigkeit vorsichtig und bringt Waschflüssigkeit, entweder arteigenes Serum oder RINGERsche Lösung sorgsam auf das Präparat. Alle diese Operationen müssen unter

Abb. 56. Dasselbe Stück nach 48 Stunden.

der Lupe geschehen. Mit einem sogenannten Kataraktmesser schneidet man aus dem Hof ein viereckiges Stück aus und setzt es vorsichtig mit einem dreizackähnlichen Messer in das neue Medium. Dann ist man sicher, nur neu ausgewachsene Zellen bei der zweiten Überpflanzung übertragen zu haben. Die embryonalen Bindegewebszellen vertragen diese anscheinend rauhe Behandlung sehr gut. Es kommt besonders darauf an, schnell und sauber zu arbeiten und größere Temperaturschwankungen zu vermeiden.

Die Umbettung muß nun je nach dem Stande der Kultur jeden 3. oder 4. Tag wiederholt werden. Ich habe gefunden, daß das embryonale Meerschweinchengewebe nur jeden 3. und 4. Tag umgebettet werden muß, während das am meisten gebrauchte Hühnergewebe oft früher das Medium verflüssigt und schon nach kürzerer Zeit eine Umbettung verlangt. Hat man nun einen Zellenstamm sich gezüchtet, der eine Reihe von Umbettungen ertragen hat, so wird die Arbeit leichter und leichter, da eine gewisse unbeabsichtigte Selektion der Zellen durch diese Art des Zellebens erreicht worden ist.



Abb. 57. Mesenchymzellen des embryonalen Huhnes. Gefärbtes Präparat (Osmiumdämpfe. Eisenhämatoxylin-Eosin.) Das Präparat ist 70 Stunden bebrütet. Die Bindegewebsfibrillen sind erst im gefärbten Präparat erkenntlich. Diese Zellen sind an einer Stelle des Präparates gewachsen, an der genügend Platz war. Nach M. LEWIS, 1917, Publ. Carneg. Inst. Nr. 226.

Mit solchen Stämmen, die CARREL und EBELING jahrelang, jetzt 9 Jahre weitergeführt, lassen sich nun die interessantesten Experimente ausführen, die ganz besonders wichtig für die Ernährungsphysiologie der Zelle werden können. Mit einer solchen, aus undifferenzierten Mesenchymzellen bestehenden Kultur (Abb. 56) läßt sich entscheiden, welche Nährstoffe diese eine Zellenart unbedingt gebraucht. Wir wissen heute schon, daß ohne Embryonalextrakt ein langdauerndes Zellleben unmöglich ist. Wir werden sicher noch finden, welche Medien nötig sind, um die Zellen zur Differenzierung zu bringen, was bei diesen Mesenchymzellen noch nicht gelungen ist, oder zu unterscheiden, ob wirklich erst die ausgeübte Funktion die Zellstruktur bedingt oder ob das Hinzufügen von Embryonalextrakt der Differenzierung hinderlich ist.

Gut gelungene Präparate dieser Art eignen sich besonders zur Anfertigung von Totalpräparaten, die eine Übersicht über die Topographie des eingepflanzten Stückes und der auswachsenden Zellen geben.

Es wird beim Konservieren von Totalpräparaten genau wie bei der Froschhaut verfahren, nur muß noch viel vorsichtiger gearbeitet werden, damit die zarten embryonalen Zellen nicht verletzt werden (Abb. 57 und 58.)



Abb. 58. Mesenchymgewebe des embryonalen Huhnes. Ein ähnliches Präparat wie das auf Abb. 57 abgebildete. Dicht gedrängte Lage bedingt die veränderte Form der Mesenchymzellen. 24 Stunden bebrütet. Nach M. LEWIS, 1917, Publ. Carneg. Inst. Nr. 226.

Man gebraucht zum Fixieren der Totalpräparate die gewöhnlich angewendeten Fixierungsflüssigkeiten, man vermeide aber, wenn es irgend angeht, nach Möglichkeit, Fixierungsflüssigkeiten, in welchen sich Alkohol befindet, da Alkohol das Plasmamedium ausfällt. Dieses aus gefälltem Eiweiß bestehende Fällungsprodukt umhüllt die Präparate mit einem feinen Schleier, der bei Betrachten der Stücke mit Immersion stört. Daher habe ich trotz anderweitiger Bedenken besonders oft mit ORTHschem Gemisch fixiert, weiter mit Carnois, seltener mit Sublimatalkohol oder nur da, wo es unbedingt notwendig ist, mit Alkohol, wie bei der Glykogen- und elastischen Faserfärbung. Will man Stücke fixieren, die in einer Salzlösung gezüchtet worden sind, so ist es unter Umständen wichtig, das Salzmedium durch ein indifferentes Medium, vielleicht Serum auszuwaschen. Ich gebe hier nur die Vorschriften für die am leichtesten anwendbaren Darstellungsmöglichkeiten. Die gebräuchlichsten Fixierungsflüssigkeiten sind folgende:

ZENKERsche Flüssigkeit.

Die ZENKERsche Flüssigkeit besteht aus einer Mischung von:

Sublimat	5,0
Kaliumbichromat	2,5
Natriumsulfuricum	1,0
Aqua dest.	100,0

Diese Substanzen werden in der Wärme gelöst. Man setzt ihnen kurz vor Gebrauch 5 Teile Eisessig zu.

Die zu fixierenden Präparate werden 24 Stunden lang in die Lösung eingelegt, dann 24 Stunden lang gründlich in fließendem Wasser nachgewaschen. Darnach gehärtet in Alkohol von aufsteigender Konzentration.

Orthsches Gemisch.

Formol 10 proz. (das in den Handel kommende ist 40 proz., man muß es entsprechend verdünnen), Müllersche Lösung.

Dieses Orthsche Gemisch ist in Mischung nur sehr begrenzt haltbar, man mischt es deshalb bei jedesmaliger Anwendung frisch und zwar

Müllersche Lösung	9 Teile
Formol	1 Teil.

Müllersche Flüssigkeit.

30 g schwefelsaures Natron und 60 g pulverisiertes doppelchromsaures Kali werden in 3000 ccm destilliertem, vorher aufgekochtem Wasser gelöst. Die Lösung erfolgt bei Zimmertemparatur langsam (in 3—6 Tagen). Man bereite deshalb die Lösung mit erwärmtem Wasser oder stelle die Flasche in die Nähe des Ofens.

Fixierung nach Carnoy.

Alkohol absolut.	3 Teile,
Chloroform	4 ,,
Acid. acetic. glac.	1 Tropfen.

Champysche Lösung.

Diese wird hergestellt aus:

1 proz. wässrige Lösung von Acid. chromic.	7 Teile,
3 proz. ,, ,, ,, Kalium bichromic.	7 ,,
2 proz. ,, ,, ,, Osmiumsäure	4 ,,

Man konserviert in dieser Lösung 24 Stunden und wäscht schnell in Aqua dest. Dann bereitet man eine Lösung aus: 1 Teil wässriger Lösung von gereinigter Pyrogallussäure, 2 Teile 1 proz. Lösung von Chromsäure. In dieser Mischung bleiben die Präparate 24 Stunden. Darnach waschen in Aqua dest. $^1/_2$ Stunde. Man bereitet weiter eine 3 proz. wässerige Lösung von Kalium bichromic. und läßt darin die Präparate 3 Tage liegen. 24 Stunden wässern in Aqua dest.

Sublimatalkohol nach Schaudinn.

Man löst 7 g Sublimat in 100 ccm kochendem destillierten Wasser, nimmt von dieser konzentrierten wässrigen Lösung 2 Teile. Alkohol absolut. 1 Teil. Es wird auch der Zusatz von einigen Tropfen Essigsäure empfohlen, den ich nur bei Amphibiengewebe anwende.

Färbung nach Giemsa.

Am leichtesten gelingen dem Anfänger die abgeänderte Giemsafärbung, die übliche Hämatoxylin-Eosinfärbung, schwieriger schon die Heidenhain-Färbung mit beliebiger Nachfärbung des Plasmas für Totalpräparate.

Die abgeänderte, den Bedürfnissen der Gewebezüchtung angepaßte Giemsa-Färbung ist nur für Totalpräparate anzuwenden. Nachdem man das Deckglas mit dem Präparat mit der Kühnschen Pinzette umgedreht hat, entfernt man vorsichtig mit einer feinen Glaspipette das noch vorhandene Plasma und pipettiert, vom äußeren Rande anfangend, Orthsches Gemisch zum Konservieren darauf. Nach ca. $^1/_2$ Stunde wird dieses abpipettiert, in derselben Weise Aqua dest. und nachdem man dies wieder entfernt hat, Alk. 70%. Man bereitet sich die Farb-

lösung in folgender Weise: Auf 1 ccm Aqua dest. 1/2 Tropfen Giemsalösung und pipettiert nun die Farbe auf, nachdem man den Alkohol in Aqua dest. ausgewaschen, vorsichtig vom Rande anfangend bis das Präparat bedeckt ist. In dieser Lösung bleibt das Präparat 24 Stunden. Darnach wird mit Aqua dest. gespült mittels Pipette und differenziert in 96% Alkohol. Dies geschieht unter dem Mikroskop und zwar bis zum rötlichen Farbumschlag. Dann bringt man das Präparat in reinen Alk. 96%, in Alk. absol., in Alk. absol. + Xylol, bis das Präparat ganz aufgehellt ist und schließt dann in Zedernöl ein.

Färbung mit Hämatoxylin nach Delafield.

Man konserviert die Präparate wie vorher angegeben in einer der Konservierungsflüssigkeiten, am gebräuchlichsten ist die Konservierung in Orthschem Gemisch, und bringt sie dann in Alk. 70%, nachdem sie in Aqua dest. gespült worden sind. Die Farblösung bereitet man aus 30 ccm Aqua dest. und 6 Tropfen Hämatoxylin nach Delafield, Farbdauer 24 Stunden. Spülen in Brunnenwasser, um die Farbe aufzuhellen, differenzieren in Salzsäure-Alkohol 1% unter dem Mikroskop, bis die Kerne deutlich hervortreten, spülen in Brunnenwasser, um die anhaftende Salzsäure herauszuwässern, spülen in Aqua dest., Präparate durch die Alkoholstufen führen; einlegen in Alk. absol. und Xylol; Xylol; einbetten in Zedernöl.

Hämatoxylinfärbung nach Heidenhain.

Präparate wie schon angegeben konservieren und in Alkohol 70% bringen. Beizen in folgender Lösung: 2,5 g schwefelsaures Eisenammonoxyd gelöst in 100 ccm Aqua dest. Darin bleiben die Präparate 6—12 Stunden; abspülen ein paar Stunden in Aqua dest. Färben mit Weigerts Hämatoxylin (30 ccm Hämatoxylin Weigert + 30 ccm Aqua dest.) 12—36 Stunden. Abspülen in Brunnenwasser. Man differenziert nun in der oben schon angegebenen Eisenlösung; zuerst bringt man kurz die Präparate in die Lösung in der angegebenen Konzentration und verdünnt diese dann auf 1/5 dieser Konzentration mit Aqua dest. und differenziert darin weiter bis zum deutlichen Hervortreten der Kernstrukturen. (Beobachten unter dem Mikroskop.) Abspülen in Brunnenwasser ca. 15 Min. Nach der Kernfärbung kann man noch eine Nachfärbung machen mit einer Plasmafärbung (Lichtgrün oder Eosin). Man bringt die Präparate bis zu Alk. 70% und fügt dem Alk. 96% ein wenig Eosin oder Lichtgrün zu, beobachtet unter dem Mikroskop diese Färbung und führt dann die Präparate wie vorher angegeben durch die Alkoholstufen, Xylol + Alkohol absol.; Xylol; Zedernöl.

Färbung nach Fixierung von Prenant, Champy oder Zenker.

Konservieren und Kernfärbung der Präparate wie bei Eisenhämatoxylin Heidenhain angegeben. Nach Differenzierung Nachfärbung mit Erythrosin 4—24 Stunden. Zum Differenzieren dieser Färbung wird folgende Lösung angewandt:

Orange wäßrige gesättigte Lösung	8 Teile.
Lichtgrün „ „	4 „
Alk. abs.	4 „
6 Tropfen gesättigter Zitronensäure.	

Präparate durch Alkoholstufen führen; Xylol + Alk. abs.; Xylol pur.; Zedernöl.

Anschließend an das embryonale Bindegewebe untersuchen wir die Veränderungen des erwachsenen Bindegewebes und zwar an dem Unterhautbindegewebe eines Säugetieres (14. Übung). Das Unterhautbindegewebe des Kaninchens ist von Maximow studiert worden, und wir folgen hier seinen Angaben. Nachdem man wie üblich im arteigenen Plasma kleine Stückchen des Unterhautbindegewebes einige Stunden gezüchtet

hat, wechselt man das Medium, indem man vorher das Stück entweder in RINGERscher Lösung oder in Serum oder in einem Gemisch von Plasma und RINGERscher Lösung auswäscht. Hierdurch werden alle Inhaltskörper der erwachsenen Bindegewebszelle, die nicht mehr abgebaut werden können, allmählich aus dem eingepflanzten Stück entfernt. Die Zelle erhält dadurch einen gewissen Anreiz zu erneuter Tätigkeit, der auch wahrscheinlich durch die Wundhormone, die aus den zerschnittenen Randzellen auswachsen, verstärkt wird. Nach kurzer Zeit



Abb. 59. Unterhautbindegewebszellen des erwachsenen Kaninchens. Schnittbild (ZENKER, AZUREOSIN, MAXIMOW). Die strukturlosen Massen stellen das Plasmamedium vor. Die Bindegewebszellen (Fibroblasten) sind mit feinen Granulationen verschiedenster Art gefüllt. Ihre Form gleicht der embryonaler Mesenchymzellen. Beachte die Mitose links oben in einer Wanderzelle. Das Präparat ist 5 Tage gezüchtet. Nach MAXIMOW, 1916. Arch. Russ. Anat. Embriol., Bd. 1.

verlängern sich nun die dem Medium zunächst gelegenen Bindegewebszellen (Abb. 59). Ihre mächtigen Fortsätze ragen weit in das Medium hinein und sehr bald fangen diese Zellen an, sich zu teilen. Nach mehreren Wechseln kann man nun neuentstandene Bindegewebszellen überpflanzen, die dann wochenlang weitergezüchtet werden können. Es ist also klar, daß das erwachsene Bindegewebe wieder aktiv werden kann und so Eigenschaften zeigt, die gewöhnlich nur dem Säugetierkörper bei der Regeneration eigen sind.

Unter den neugebildeten Zellen finden sich zwei sehr verschieden aussehende Zellarten, mächtige Bindegewebszellen, stark vakuolig, die den gewöhnlichen Mesenchymzellen gleichen und von MAXIMOW als „Wanderzellen“ (Abb. 60) angesprochene Gebilde, die sich während ihres Verweilens in dem Medium sehr stark mit groben Körnern beladen, die den sog. Degenerationskörnern, wie wir sie auch in den embryonalen

und erwachsenen Bindegewebszellen während der Züchtung in geringem Maße finden, gleichen. Bei vitaler Neutralrotfärbung nehmen diese Körner die Färbung sehr stark auf. Auch in ihnen finden sich Mitosen, die besonders in Schnittbildern leicht aufzufinden sind.

Bei dem Studium der erwachsenen Gewebe ist es notwendig, außer den Totalpräparaten, die nur von sehr kleinen und dünnen Stückchen angelegt werden können, zur Schnittmethode zu greifen und zwar unterscheiden wir hier zwei verschiedene Arten, die neu entstandenen Gewebe zur Verarbeitung mit dem Mikrotom vorzubereiten. Entweder wir betten das eingepflanzte Stück und die neuentstandenen Zellen mitsamt dem Medium ein oder nur das eingepflanzte Stück. Die zweite Art unterscheidet sich wenig von der allgemein üblichen Art des Einbettens und Schneidens. Bei der ersten Art ist folgendes zu beachten.

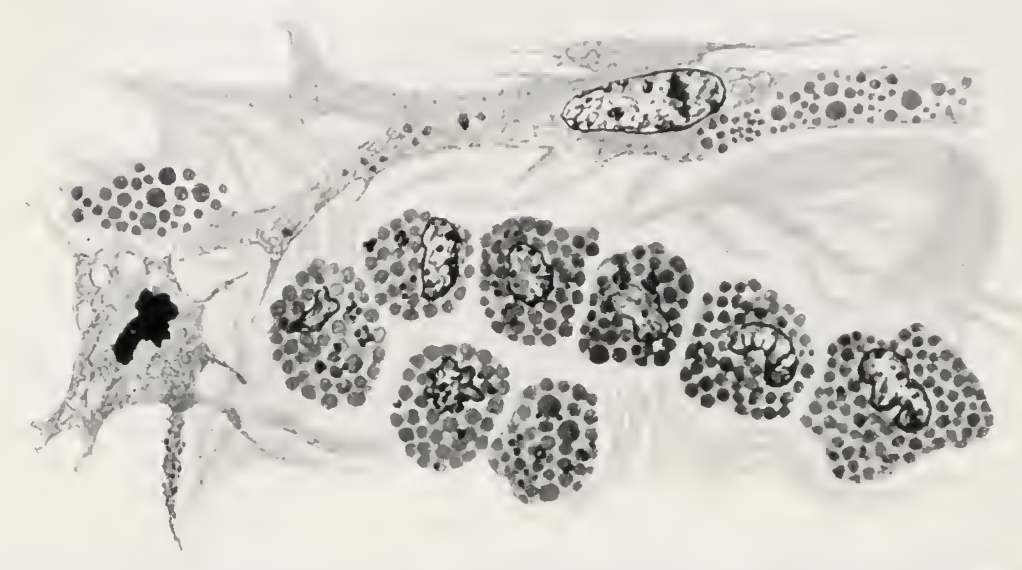


Abb. 60. Dasselbe Gewebe wie auf Abb. 59 dargestellt, aber eine Stelle mit vielen Wanderzellen ausgewählt. Beachte die riesengroße Mesenchymzelle mit Vakuolen und die mit groben Granulationen gefüllten Wanderzellen. 2 Tage gezüchtet. Nach MAXIMOW, 1917, Arch. Russ. Anat. Embriol., Band 1.

Entweder wir züchten die Stücke schon gleich auf Deckgläschen, welche einen Überzug von Zelloidin erhalten haben und dann sterilisiert worden sind; oder es muß darauf geachtet werden, daß die kolloidale Plasmamasse auch konserviert wird, damit die neu entstandenen Zellen, auf die es uns besonders ankommt, nicht verloren gehen. Eine allgemeine Regel beim Einbetten dieser kleinen Stücke ist die, daß alles, was an Flüssigkeiten zum Einbetten benutzt wird, vorher filtriert werden muß, auch das verwendete Paraffin, weil man sonst diese kleinen Stückchen nicht herausfinden kann. Man nimmt, wie vorher beschrieben, das Deckgläschen mit dem Gewebe vom Objektträger ab, dreht es vorsichtig um und entfernt die überschüssige Flüssigkeit mit einer Kapillarpipette. Hierauf konserviert man das Stückchen, indem man rund herum um das Medium von der Konservierungsflüssigkeit mit einer Kapillarpipette zutropft und allmählich mit der Konservierungsflüssigkeit immer mehr zur Mitte geht, bis schließlich das ganze Stück bedeckt ist. Man läßt es $^1/_2$ Stunde stehen, und ebenso vorsichtig entfernt man die Konservierungs-

und später die Härtungsflüssigkeiten. Ist das Stück in Chloroform oder in Äther, je nach der gewählten Einbettungsmethode (Chloroformparaffin, Zelloidin), so wird sich gewöhnlich schon das eingebettete Stück von dem Deckgläschen lösen, auf dem es bis zu diesem Moment geblieben ist. Sollte es sich nicht abheben, so entfernt man mit einem feinen Messer das Stück mit dem Medium von dem Deckglas und hat dann ein scheibenförmiges Gebilde vor sich, in dessen Mitte sich das eingepflanzte Stück befindet. Wenn man nun Flachschnitte macht, erhält man mit dieser Methode ein topographisches Bild der neu entstandenen Zellen, ohne daß eine einzige verloren geht. Die üblichen Färbemethoden können nun nach den entsprechenden Konservierungsmethoden angewandt werden. Von Maximow wird besonders empfohlen, mit Zenker zu fixieren und mit Azur-Eosin (Maximow) die Schnitte zu färben.

Die zweite Art der Einbettung wird gewöhnlich angewandt, wenn wenig Zellenauswanderung und Zellenneubildung vorhanden ist und es besonders darauf ankommt, die Vorgänge in dem eingepflanzten Stück zu studieren (Herzklappe, Muskulatur usw.). Man fixiere mit den für die betreffenden Färbungen angegebenen Flüssigkeiten. Nachdem das Gewebe darin $^1/_2$ bis 2 Stunden gelegen hat, bringt man es aufwärtsgehend in die Alkoholreihe, beginnend mit 70% Alkohol. In jedem Alkohol verbleibt das Stück etwa $^1/_2$ bis 2 Stunden, je nach seiner Größe und nach der Art der Gewebe. Je zarter ein Gewebe ist, desto vorsichtiger müssen die Konservierungsflüssigkeiten zugesetzt werden. Im Alk. abs. läßt man das Stückchen nur etwa $^1/_2$ Stunde liegen und bringt es in Chloroformalkohol und sodann in reines Cholroform, worin es über Nacht liegen bleiben kann, ohne geschädigt zu werden. Es empfiehlt sich sogar, Stücke, die aus irgendeinem Grunde nicht gleich bis zum völligen Einbetten gebracht werden können, in Chloroform, dem man dann ein wenig weiches Paraffin zufügt, zu verwahren. Vom Chloroform bringt man die Stücke in Chloroformparaffin, d. i. weiches Paraffin mit Zusatz von reinem Chloroform (weiches Paraffin hat einen Schmelzpunkt von ca. 40—42° C). In Chloroformparaffin läßt man das Material wenigstens 2 Stunden liegen, damit es recht aufgehellt werde, längeres Verweilen schadet, wie oben schon erwähnt, nichts. Sodann bereitet man sich zwei kleine Glasschälchen mit weichem Paraffin, bringt die Stücke erst in das eine, dann in das zweite Schälchen, damit alles anhaftende Chloroform gut entfernt wird, und bringt das Material schließlich in ein drittes, zurechtgestelltes Schälchen mit geschmolzenem harten Paraffin (hartes Paraffin hat einen Schmelzpunkt von ca. 50 bis 52° C). Der Paraffinofen muß genau auf der Temperatur des Schmelzpunktes gehalten werden, weil höhere Temperaturen die Gewebe zerstören.

Zum eigentlichen Einbetten schmilzt man hartes Paraffin in einem kleinen Glasschälchen, das am besten einen etwas gerundeten Boden hat. Dahinein legt man das Gewebestück mitten auf den Boden mit der Fläche, an der man mit dem Schneiden beginnen will, nach unten. Man hält, um das Paraffin schnell zum Erstarren zu bringen, das Gläschen

mit dem eingebetteten Stück in eine Schüssel mit Eiswasser, sobald sich obenauf eine dünne Haut bildet, läßt man das Eiswasser über das Einbettegefäß fließen und stellt schließlich zum endgültigen Hartwerden das Ganze eine Zeitlang in das Eiswasser hinein.

Besonders zu beachten ist beim Einbetten der Gewebestücke, daß man die zarten, empfindlichen Stücke nie mit Pinzetten anfaßt beim Umlegen von einer Flüssigkeit in die andere, sondern man bedient sich eines Spatels, womit man die Stücke aufhebt, oder besonders kleine Stücke saugt man mit einer ganz trockenen Pipette auf. Spatel oder Pipette sind beim Umlegen in die verschiedenen Paraffinsorten anzuwärmen. Sind die Stücke sehr klein, so arbeite man unter der Lupe.

Sehr kleine Stücke des Gewebes, die man im Paraffin schwer finden kann, sind, wenn sie bis zum Alkohol von 96% gebracht sind, mit einem Tropfen Eosin anzufärben. (Diese Farbe ist später vor dem eigentlichen Färben wieder auszuwaschen, dies geht meist schon bei der Alkoholbehandlung vor sich.)

B. Echtes Wachstum des embryonalen Muskelgewebes und Ab- und Umbau der erwachsenen Muskulatur.

Für das Studium des Muskelgewebes wählen wir das Amnion des Hühnerembryos, das Herz und die Skelettmuskel desselben von am besten 5—6 Tage alten Embryonen (15., 16., 17. Übung).

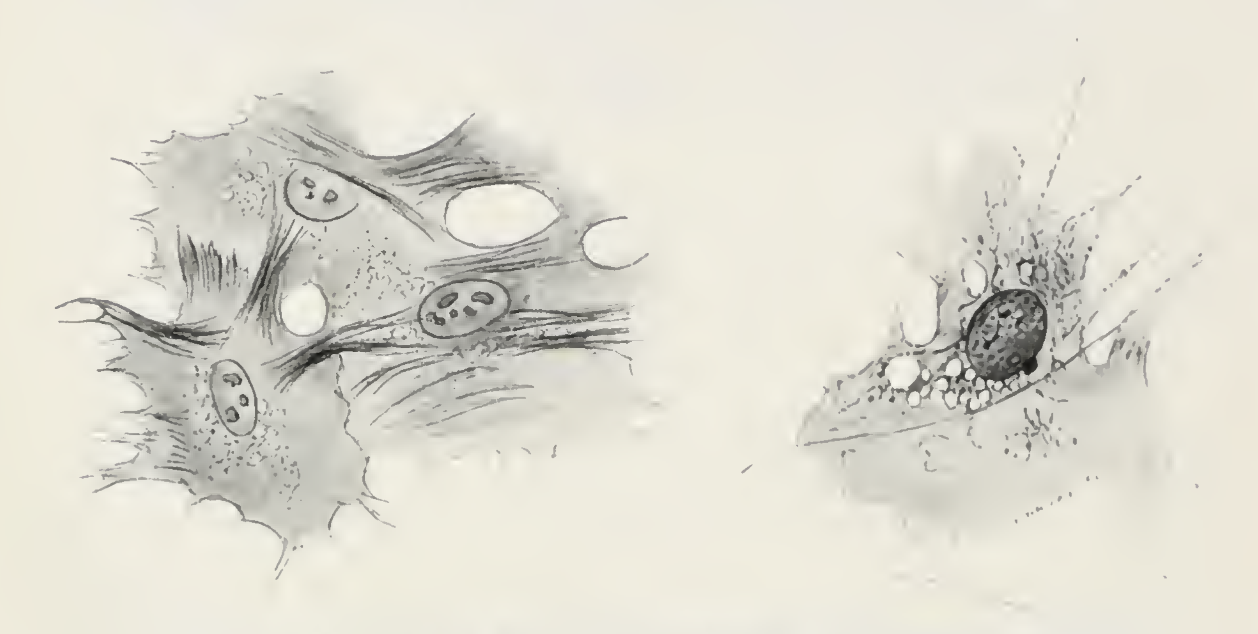


Abb. 61 u. 61 a. Zellen des Amnion eines 5 Tage alten Hühnerembryo, 48 Stunden in Kultur (Locke-Lewis) Abb. 61, fixiert mit Joddämpfen, gefärbt nach Mallory, Abb. 61 a. Nach M. Lewis wie Bild 60.

Die glatte Muskulatur des Amnion.

Nachdem wir wie gewöhnlich kleine Stückchen des Amnion in Locke-Lewisscher Lösung oder in Plasma vorbereitet haben, lassen sich schon nach kurzer Zeit der Bebrütung die verschiedenen Elemente des Amnion erkennen. Das Amnion besteht aus den sog. epithelialen Zellen, die ein einschichtiges Zylinderepithel bilden, dessen Elemente

Fetttropfen und Dotterkugeln enthalten. Schon die normale „epitheliale" Zelle ist stark vakuolig. Das zweite Element ist die glatte Muskelzelle des Amnion, Nerven sind bis jetzt nicht im Amnion nachgewiesen worden. In der Kultur breiten sich die „epithelialen" Zellen als große, flache, fast immer hexagonale (Abb. 61) Zellen aus. Sie bilden häufig in der Kultur eine Art Membran, während die Muskelzellen in Form von schmalen Streifen, eine hinter der anderen, in der Richtung der Auswanderung durch das Medium sich schieben. Alle Muskelzellen sind durch ihre starke Lichtbrechung kenntlich. Sowohl M. LEWIS wie LEVI erwähnen, daß die Muskelzelle von den Mesenchymzellen durch ihr Lichtbrechungsvermögen lebend zu unterscheiden ist. Diese bandartigen, langgestreckten, an beiden Enden zugespitzten und nicht verzweigten Muskelzellen sind oft rund herum um das eingepflanzte Stück in rhythmischer Zusammenziehung. Hat sich aber eine solche Muskelzelle unter dem Deckglas ausgebreitet, so zieht sie sich gewöhnlich nicht mehr zusammen, sondern wird erst wieder kontraktionsfähig, wenn sie sich aus der ausgebreiteten Lage in die gestreckte Lage zurückgewandelt hat. In der sich zusammenziehenden, lebenden Muskelzelle sind keine Fibrillen zu sehen, sondern nur eine Verdickung des Plasmas an den Knotenpunkten der Zelle (Abb. 62).


Abb. 62. 3 Muskelzellen des Amnion, deren schlagende Bewegung beobachtet wurde und die später fixiert wurden. Von einem 8 tägigem Hühnerembryo. 24stündige Kultur in Locke-Lewis. (Zenker, Eisenhämatoxylin.) Nach M. Lewis 1917. 272. Publ. Carneg. Inst.

Dauerpräparate der Muskelzelle lassen sich sehr gut nach Fixierung mit ZENKERscher Lösung und Färbung nach HEIDENHAIN darstellen.

Die Muskelzelle des Herzens.

Wird embryonales Herzgewebe eingepflanzt, so haben wir schon bei der 13. Übung gesehen, daß in den meisten Fällen mesenchymales Gewebes auswächst. Dieses bleibt in einem Medium, das Plasma und Embryonal-Extrakt enthält, undifferenziert. Von einem 4 Tage lang bebrüteten Embryo züchtete LEVI Zellen aus dem Herzgewebe (Abb. 65), die lebhaft auswanderten und über deren Charakter sich nichts aussagen läßt. Sie können werdende Muskelzellen oder Mesenchymzellen sein. Sie sind in lebhafter Teilung. Dagegen erweisen sich Zellen, die aus dem Herzen eines 6 Tage alten Embryo ausgewachsen sind, deutlich sowohl strukturell als auch funktionell als Muskelzellen. Sie wurden 3 Tage lang schlagend beobachtet und morphologisch (s. Abb. 66) zeigen

sie ganz die Eigenschaften der Herzmuskelzellen. In solch zweifelhaften Fällen hat man sich nur an die Funktion zur Stellung der Diagnose zu halten.

Die Herzmuskelzelle des sechs Tage alten Embryo zeigt auch in der Gewebekultur lebend keine Streifung, wohl aber in der Bewegung eine Verdickung und Verdünnung der Plasmamasse um den Kern herum. Die sehr kleine Zelle zeichnet sich auch im Leben durch ihre spitzen, selten verzweigten Fortsätze aus. Während der Zellteilung runden sich diese Zellen ab und bleiben nur mit ihren Nachbarn durch feine Fortsätze verbunden, während sie sonst in der Gewebekultur meist ein Synzytium bilden. Für gewöhnlich gilt als Charakteristikum ihr gestreckter Kern. Dieses Kennzeichen fällt in der Gewebekultur fort. Die Muskelzelle hat meistens einen runden



Abb. 63 u. 64. Glatte Muskelzellen des Amnion von einem 4 Tage alten Hühnerembryo. 48 Stunden in Locke-Lewis gezüchtet. Beide Bilder aus derselben Kultur. Bild 63 zeigt die kontraktile Substanz nach der Färbung als graue Fäden in der Zelle. Bild 64 ist aus demselben Präparat aus einer Stelle, an welcher sich die Zellen ausbreiten können. Nach M. LEWIS 1917 wie bei Bild 62.

Kern, wahrscheinlich weil der größere Vorrat an Raum in dem flüssigen Medium die weitere Ausdehnung des Zellkernes gestattet. Von LEVI (Abb. 66) ist die Entwicklung von Fibrillen, die sich durch Färbung nachweisen lassen, in späteren Stadien des Embryonallebens

festgestellt worden. Gut gelungene Präparate zeigen Zellen, die 70—120 mal in der Minute schlagen. Gewöhnlich schlagen ganze Zellschichten koordiniert. Auch Stücke des zerteilten embryonalen Herzens

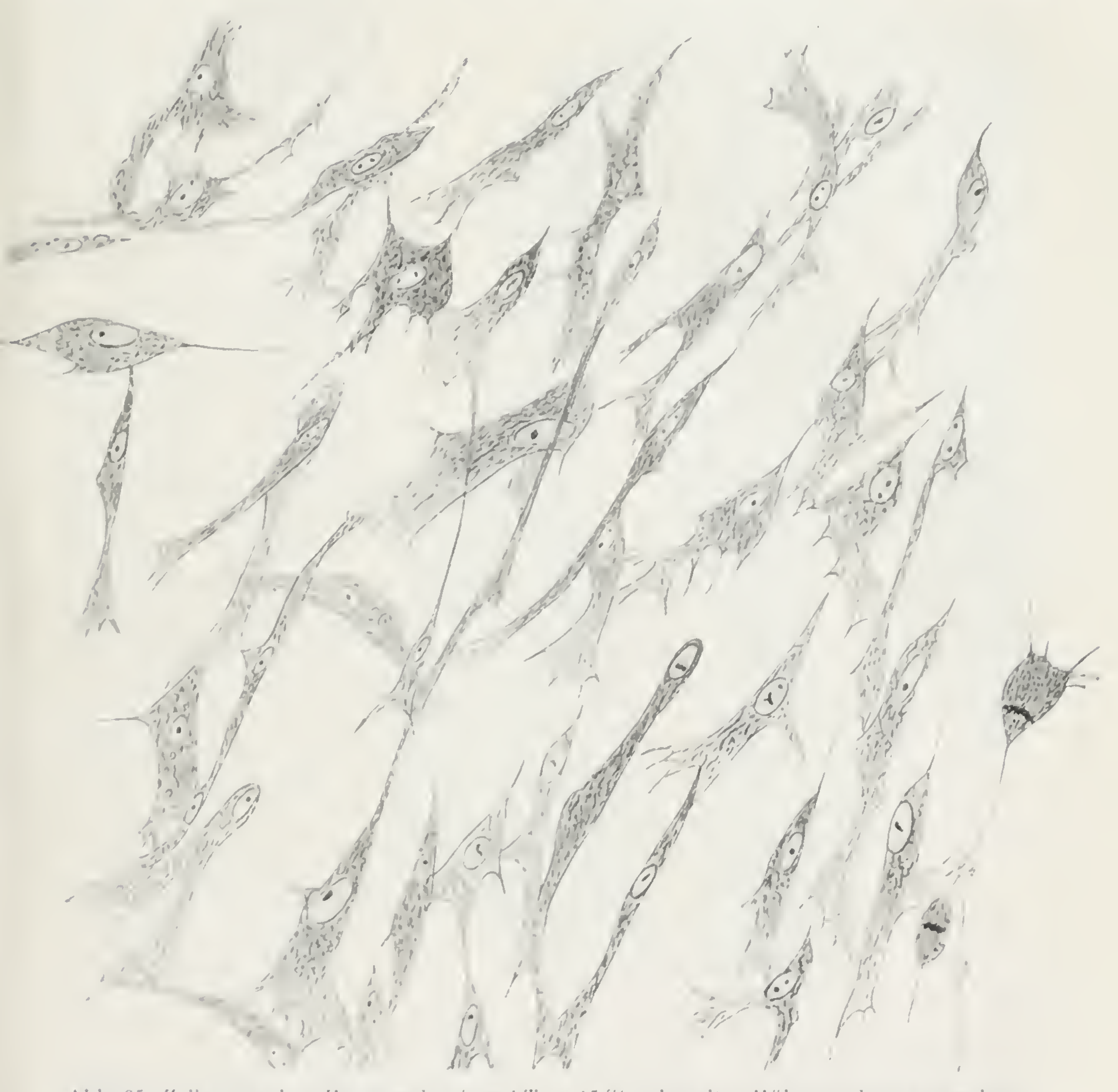


Abb. 65. Zellen aus dem Herzgewebe eines 4 Tage 15 Stunden alten Hühnerembryos gewachsen. 49 Stunden gezüchtet. Es ist nicht zu erkennen, ob die ausgewanderten Zellen Mesenchymzellen oder Myoblasten sind. Fixiert und gefärbt nach Maximow, abgeändert nach Levi. Nach Levi 1919, Arch. Ital. di Anat. e di Embriol. Bd. 16.

schlagen in den von uns gebrauchten Kulturmedien. Teile des Herzens können noch 4—5 Tage nach der Explantation schlagen, und abgeschnittenes und wieder eingepflanztes Herzgewebe schlägt noch nach 126 Tagen. Die gleichen Färbemethoden, wie beim Amnion angegeben sind, können hier angewandt werden. (Abb. 63 u. 64.)

Die quergestreifte Muskulatur.

Schon durch die äußere Art der Bewegung unterscheiden sich die Myoblasten, die später die Skelettmuskel bilden, von den vorher beschriebenen Zellarten. Ein explantiertes Stück vom Skelettmuskel

des Huhnes, 8 Tage alt, zeigt wie immer Bindegewebszellen, wenig isolierte Muskelfibrillen und viele hier und da zerstreute Myoblasten. Diese sind synzytial miteinander verknüpft; trennen sieh nun ab und zu Zellen von diesem vielkernigen Synzytium und wandern fort, so entsteht der typisehe isolierte Myoblast ohne Fibrillen. Man wird also annehmen können, daß die synzytiale Verbindung dureh die bei der Fortbewegung ausgeschiedene fibrilläre Substanz gebildet wird. Während nun die Herzmuskelzelle eine sehlagende Bewegung ausführt und die Amnionmuskelzellen eine fließende, führen die Skelettmuskeln eine ruekweise Bewegung aus. Lewis hat in den Zellen des 8 bis 10tägigen Embryo keine Streifung gesehen und behauptet, daß nur naeh dem Tode Verdiehtungs- und Verdünnungszentren als Streifen der Mnskulatur siehtbar werden.

Abb. 66. Zellen aus einem 6 Tage alten embryonalen Herzen. Die Zellen schlugen bis zum 3. Tage und wurden dann fixiert. Typische Herzmuskelzelle. Fixierung, Färbung wie bei Bild 65. Nach Levi 1919.

Vitalfärbung zeigt bei allen drei besehriebenen Zellarten Mitoehondrien. Färbung naeh Fixierung wie für das Amnion besehrieben, gibt auffallend sehöne Bilder.

Die glatte Muskulatur des erwaehsenen Tieres.

Von großer Bedeutung war es, als Champy 1914 zum ersten Male gezeigt hat, daß Blasenmuskelgewebe — er nahm die Blase des Kaninehens — einer Entdifferenzierung und späteren mitotisehen Teilung fähig ist. Der glatte Muskel entdifferenziert sieh auf folgende Weise: Die Muskelzellen bilden eine Art verjüngtes Zellplasma, das um den Kern herum und zwisehen den einzelnen Fasern sieh sammelt (Abb. 67). Die Enzyme dieses neugebildeten Zellplasmas müssen die Fähigkeit haben, die Muskelfibrillen zu lösen. Sehr bald bleibt nur der obere und

untere Pol der Zelle mit Fibrillen erfüllt. Die Zellmitte nimmt ein gänzlich undifferenziertes Aussehen an, sie teilt sich unter Bildung von gut ausgebildeten Kernfiguren. Nach 2—3 Teilungen ist es nicht mehr möglich, die Muskelzelle als solche zu erkennen, wenn sich nicht ab und zu ganz feine Fibrillen in einzelnen Zellen vorfänden. Die neugebildeten Zellen sind rundlich. So erstaunlich dieser Umbau der glatten Muskulatur auf den ersten Blick auch erscheint, so brauchen nur die schon bekannten Fähigkeiten der glatten Muskulatur, die sich bei der Regeneration zeigen, zum Vergleich herangezogen zu werden. Auch bei der Regeneration findet sich diese Entdifferenzierung und spätere amitotische oder mitotische Teilung der glatten Muskelzelle des erwachsenen Tieres. Gefärbt wird hier besonders nach dem Verfahren von HEIDENHAIN - PRENANT nach Fixierung nach CHAMPY (18. Übung). Ehe wir das Wachstum der Epithel - Zelle eingehend studieren, fassen wir noch einmal zusammen, was wir bis jetzt über die Merkmale der Fibroblasten und Myoblasten gelernt haben. Haben wir nur Mesenchymgewebe in der Kultur und erscheinen an beiden Polen scharf zugespitzte Zellen — nadel- oder spindelähnliche Formen, so sind diese stets von embryonalen Muskelzellen abzuleiten. Die Mesenchymzelle oder eigentliche spätere Bindegewebszelle ist durch ihre stark verzweigten Ausläufer, ihren wenig lichtbrechenden Zellinhalt, das Vorhandensein von Mitochondrien und Granulationskörnern im Plasmamedium kenntlich. Die beiden letzten Charakteristica teilt sie auch noch mit den Muskelzellen, deren Formbeständigkeit größer ist als die der Fibroblasten, wenn der Myoblast isoliert liegt. Selbstverständlich kann erst die Fähigkeit, sich zusammenzuziehen, die Endentscheidung sichern. Embryonale Herzmuskeln (Abb. 66) sind oft durch ihre synzytiale Anordnung kenntlich und durch ihre plumpen Formen. Das ganz junge embryonale Herz enthält Endothelzellen und Mesenchymzellen, die teils schon in Muskelgewebe umgewandelt sind, teils diese Umwandlung schon physiologisch durchgemacht haben, aber noch nicht morphologisch zeigen, teils auch aus noch nicht diffe-

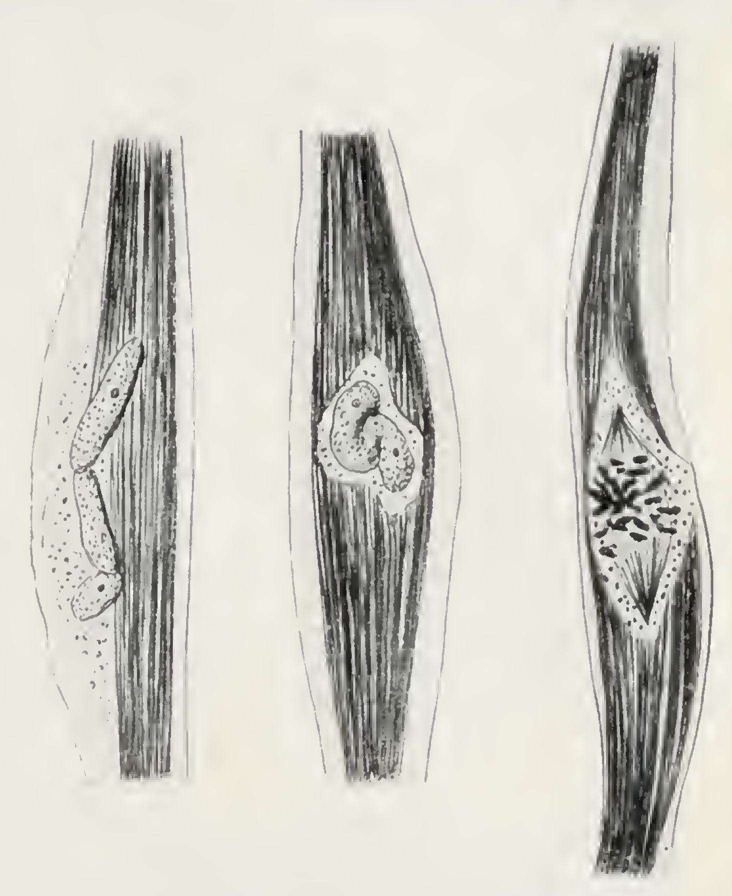


Abb. 67. Entdifferenzierung der Blasenmuskulatur des Kaninchens. Fixiert nach Champy, Färbung nach Prenant. Nach Champy 1914. Arch. de Zool. Exp. et Gen. Bd. 53. Notes et Revue.

renzierten Mesenchymzellen. Es fehlen uns bis jetzt Normentafeln der Gewebezüchtung, in denen z. B. einwandfrei nachgewiesen ist, embryonales Herz vom Huhn, so und so viele Tage bebrütet, liefert diese Formen von Zellen, diese Zellarten wandern zuerst aus dem betreffenden Gewebe, wenn es in dem und dem Medium so und so lange gezüchtet wird. Schwieriger ist das Erkennen der erwachsenen, abgebauten Formen, und nur geduldiges Beobachten führt zur richtigen Diagnose.

C. Echtes Wachstum der Epithelgebilde, gezeigt an dem embryonalen Epithel und Verhalten der erwachsenen Schilddrüsen und Geschlechtsdrüsen.

Es ist eigentümlich, daß alle die Zellarten, die wir vom äußeren Keimblatt ableiten, also Haut-, Sinnes- und Drüsenepithelien, erst spät gezüchtet worden sind und daß die Erfolge, die bei der Züchtung



Abb. 68. Totalpräparat einer 8 tägigen Gewebekultur der embryonalen Hühnerhaut von 13 Tage altem Embryo. Beachte das fast reine Auswachsen der Epithelzellen oben rechts, das überwiegende Anwachsen der Zellen des Unterhautbindegewebes an fast allen anderen Wundrändern. Totalpräparat. (Orth. Giemsa.) Original nach Erdmann.

der Haut erzielt worden sind, gering sind und keine echte Kultur, die jahrelang lebt, bis jetzt gelungen ist. Wenn wir z. B. ein Stück embryonale Hühnerhaut von einem Embryo, bei dem die Federanlagen noch nicht äußerlich erkenntlich sind, in Hühnerplasma mit Ringer im Verhältnis wie 1 : 1 verdünnt legen (19. Übung), so entwickeln sich be-

sonders stark die Mesenchymzellen und die Epithelzellen bleiben weitaus im Wachstum zurück. So wird das embryonale Bindegewebe aus einem Stück Haut herauswachsen (Abb. 68) und sich nur rund herum um das Explantat mit einer dünnen Schicht neugebildeter Epithelzellen bedecken. Diese Epithelzellen nehmen beim Huhn sehr oft eine halbmondförmige Gestalt an und eignen sich besonders zum Studium der Mitosen. Wohl nirgends lassen sich die Mitosen des Vogelgewebes besser nachweisen, als in den Epithelzellen des Huhnes. Auch ist

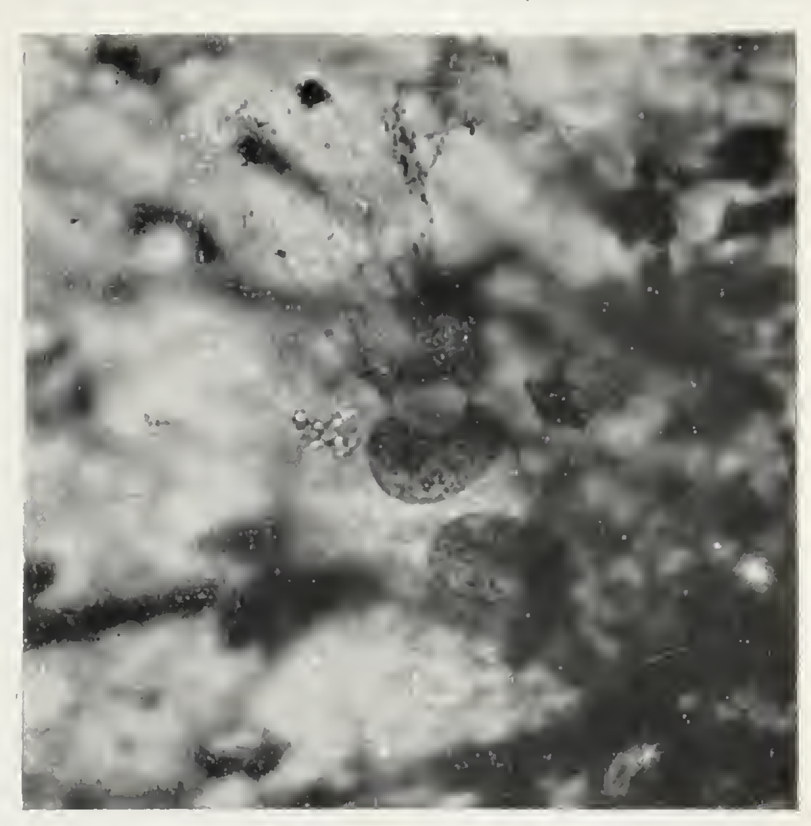


Abb. 69. Epithelzellen aus demselben Präparat

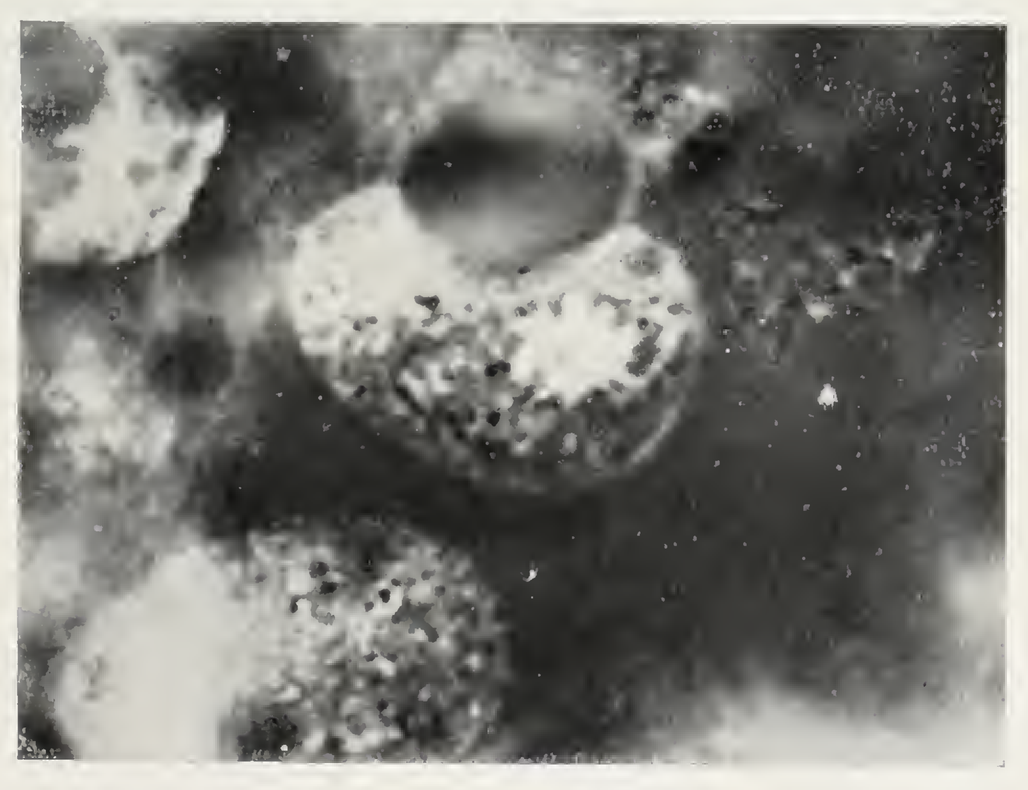


Abb. 70. Stärker vergrößerte Zellen der Abbildung 69, um die Chromosomen während der Metaphase zu zeigen.

während der Züchtung die Zählung der einzelnen Chromosomen leicht, während man sonst im allgemeinen Schwierigkeiten bei der Zählung

der Kernteilungsfiguren hat (Abb. 70). Manche dieser Zellen zeigen schwarzes Pigment und, was besonders zu beachten ist, sie haben runde, niemals scharf gezackte und mit spitzen oder stumpfen Pseudopodien versehene Ränder. Diese Glattrandigkeit scheint dem



Abb. 71. Reines Epithelgewebe ohne Beimischung von Bindegewebe nach 6 Wochen Züchtung. Nach Fischer 1922. Journ. exp. Med. Bd. 34.

Epithelgewebe des Vogels eigen zu sein, im Gegensatz zu den Epithelzellen der Froschhaut, deren Gestalt (s. Abb. 24, S. 28) sehr stark wechselt. Noch nach 8 Tagen bewahrt in der Gewebezüchtung die Epithelzelle ihren Charakter, und die neugebildeten Zellen sind, wie Abb. 69 zeigt, wirklich wieder der Form nach Epithelzellen. Es muß ein gewisser Antagonismus zwischen Epithelzellen und Bindegewebszellen bestehen. Die Bindegewebszellen mit ihrer starken Wachstumstendenz scheinen die schnelle Vermehrung der Epithelzellen zu verhindern. Beim Frosch (Rana pipiens) sind die Verhältnisse gerade umgekehrt. Hier wächst nach Uhlenhuth das Bindegewebe nur minimal, doch scheint diese Regel nicht durchgehend zu sein, denn bei Rana esculenta habe ich oft bei etwas flüssigen Medien auch Bindegewebswachstum bei Hautkulturen gesehen (s. S. 26).

Präparate von der embryonalen Haut lassen sich sehr gut mit der Heldschen Nervenfärbung färben, jede andere Färbung ist aber auch erfolgreich.

Beim Studium der embryonalen Hühnerhaut fallen die Federanlagen auf. Die Bestandteile der Haarscheide und der Haarkeime

beginnen sehr oft heftig zu wachsen, besonders wenn Teile derselben beim Zerschneiden der Gewebe verletzt worden sind. Auch hier ist das Bindegewebe weitaus am stärksten wachsend, wahrscheinlich weil Bindegewebe schon an sich den Bedingungen, die der Gewebekultur eigen sind, besser angepaßt ist als die Epithelzelle, die ja an reichliche Luftzufuhr in ihrem ganzen Leben gewöhnt ist.

Heldsche Nervenfärbung.

Konservieren der Präparate in 2 proz. Formalin 15—18 Stunden, abspülen und beschicken mit Alk. 70 $^0/_0$, färben in verdünnter Lösung (6—8 Tropfen der Farblösung auf 15 ccm Wasser) von Heldschem Molybdänsäure-Hämatoxylin 12 Stunden. Differenzieren 24 Std. in Boraxferrycyankalilösung von 5—6 $^0/_0$ gelöst in Aqua dest. Abspülen in Brunnenwasser, durch Alkoholstufen führen, Xylol + Alk. abs.; Xylol Cedernöl.

Fischer gelang es, wie schon erwähnt, jetzt endlich, im Jahre 1922, reines Epitelgewebe zu züchten, und zwar ging er so vor: Mit einem Katarakt-Messer nahm er aus dem embryonalen Hühnerauge die Linse heraus. Ein feiner, schwarzer Rand der Iris bleibt unbeabsichtigt an der Linse hängen. Die Linse wird dann in 3—4 kleine Stücke geschnitten und wie gewöhnlich in einem Medium gezüchtet, das aus Embryonal-Extrakt und Hühnerplasma zu gleichen Teilen besteht. Die Linsenelemente wachsen nicht, aber mitunter kann nach 48 Stunden eine kleine Wucherfläche von Epitel unter dem Mikroskop oder der Lupe gefunden werden. Sehr oft aber zeigt sich erst Epithelwachstum nach mehreren Umpflanzungen. Sollte man schon gleich in dem ersten Medium Fibroblasten entdecken, so ist keine Hoffnung, daß man reine Epithelkulturen bekommt.

Zu der 20. Übung also wird man sich Embryonal-Extrakt und Plasma des Huhnes zurecht stellen und aus einem jungen Hühnerembryo die Linse herausschneiden. Man bemüht sich, nur die Linse herauszubekommen, denn es bleibt immer ein wenig Gewebe der Iris daran hängen. Ehe man die Linse zerschneidet, macht man sich die hängenden Tropfen zurecht. Da Epithelgewebe einer Unterlage zum Wachstum zu bedürfen scheinen, so setze man erst einen Tropfen von Plasma und Embryonal-Extrakt auf das Deckgläschen. Sobald dies geronnen ist, lege man das Gewebe auf die Oberfläche des Tropfens. Abbildung 71 zeigt eine 6 Wochen alte Kultur von reinen Epithelzellen, in der man auch Mitosen sehen kann. Diese Kultur ist jetzt schon über 4 Monate weitergeführt. Und so wird es in Zukunft möglich sein, mit reinem Epithelgewebe Experimente der verschiedensten Art auszuführen.

Ektoderm der Haut und des Amnion wachsen aus in der Form von Membranen, ebenso das Pigmentepithel der Retina. Auch die Epithelzellen der Froschhaut schieben sich in halbflüssigen Medien membranähnlich vor. Die Leberzellen, die Schilddrüsenzellen, das Nierenepithel der Tubuli wachsen oder wandern meistens auch als zusammenhängende Zellflächen aus, während die Blut- und Wanderzellen der Milz, des

Knochenmarks, der Lymphknoten und der Thymus als isolierte Zellen auswandern und isoliert bleiben.

Zum Studium der Drüsenzellen wählen wir die Schilddrüse eines jüngeren Tieres. Die embryonale Schilddrüse hat kein spezielles Interesse, da sie sich nicht in dem Plasmamedium von der erwachsenen Schilddrüse abweichend verhält (21. Übung).

Hat man sich Schilddrüsen-Gewebekulturen von der Schilddrüse des Kaninchens in homogenem Plasma angesetzt, so kann man schon am nächsten Tage bemerken, daß der kolloidale Inhalt in den Lumina sich zusammenballt und teilweise resorbiert wird. Die Zellen, welche die Lumina auskleiden, werden im Verlaufe der nächsten Tage höher und fangen an, sich zu teilen, so daß die Lumina fast ganz ausgefüllt sind. Neue kolloidale Masse wird nicht gebildet. Während dieser Vorgang in den unverletzten Teilen der Schilddrüse vor sich geht, beobachten wir, daß der mittlere Teil degeneriert, während die Randpartien, in welchen die Tubuli angeschnitten sind, allmählich vernarben, so daß eine gewebeähnliche Verbindung entsteht, die kaum an die frühere Schilddrüse erinnert (Abb. 72). Zellen, die ganz am äußersten Rande des eingepflanzten Stückes sind, schieben neue Abkömmlinge in das Medium. Sind Stellen getroffen, die reichlich Bindegewebe enthalten, so findet auch hier ein starkes Wuchern des Bindegewebes und ein Zurückbleiben des Epithelwachstums statt. Die Thyreoidea ist häufig zu Transplantationen benutzt worden und nach den Arbeiten von Christianis wissen wir, daß die indifferent gewordenen Drüsen sich im Transplantat wieder differenzieren. In der Gewebekultur findet kein Wiederherstellen der Funktion in neugebildeten Zellen statt, wahrscheinlich weil der fehlende Blutstrom die für die Neubildung des Kolloids nötigen Stoffe nicht herbeiführen kann, während im Körper des Wirtes dies möglich ist. Sehr schlechte Resultate sind bei der Schilddrüse bei heteroplastischer Transplantation erzielt worden, während in dem hängenden Tropfen kein großer Unterschied des Verhaltens der Thyreoideazelle in speziesfremden Medien sich finden läßt.

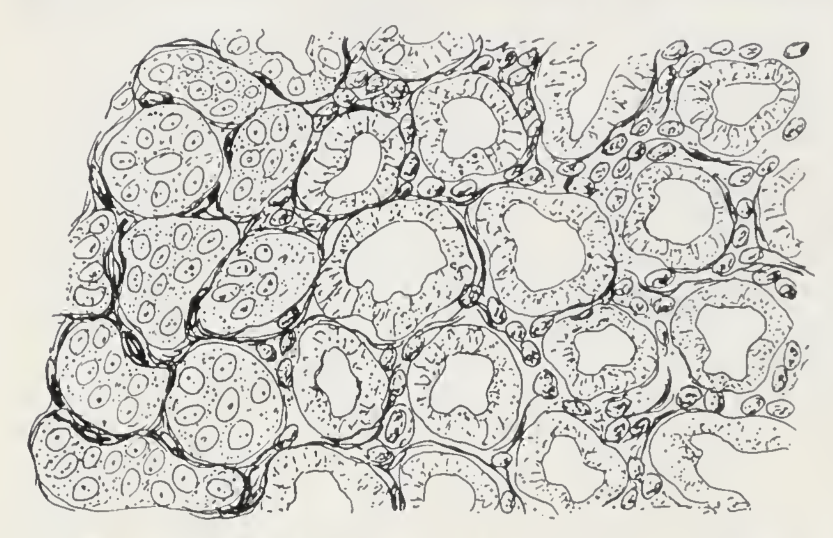


Abb. 72. Narbengewebe, entstanden aus den verletzten Drüsenschläuchen der Schilddrüse (links), rechts die kolloidleeren Drüsenschläuche und dazwischen das wuchernde Bindegewebe. Nach Champy 1915. Arch. de Zool. Exp. et Gén. Bd. 55.

Besonders interessant sind die im Gewebe auftretenden, sehr normal sich abspielenden Mitosen, die zeigen, daß ebenso wie die Zellen der erwachsenen Muskulatur auch die Zellen der nicht fötalen Drüse latent

vermehrungsfähig sind. Es ist notwendig, jeden Tag die Gewebestückchen mit Serum auszuwaschen und in frisches Plasma zu tun. In den Plasmahof hinein wachsen Drüsenzellen in Form von Bändern oder Zellknötchen, die oft noch einen Kutikularsaum zeigen.

Auch das Verhalten der kolloidalen Substanz ist bemerkenswert. Schon nach 24 Stunden hat in den kleineren Drüsengängen eine vollständige Resorption der kolloidalen Substanz stattgefunden. Bis zu 24 bis 48 Stunden hat aber die Drüse noch neue kolloidale Substanz ausgeschieden, so daß sie noch ungefähr 48 Stunden in der Gewebezüchtung funktioniert. Je größer das eingeflanzte Drüsenstück ist, je länger kann man noch Kolloid in ihm nachweisen, später aber findet die Entdifferenzierung, der vollständige Abbau der spezifischen Zellstruktur statt, hierauf fängt das Drüsenepithel an zu wuchern und kann die Lumina vollständig ausfüllen. Alle Drüsenschläuche aber, die, als sie in das Plasmamedium gesetzt wurden, verletzt worden waren, haben schon nach 2 Tagen ein vollständiges Epithel gebildet, so daß, wenn man einen Schnitt durch das eingepflanzte Stückchen macht, der Unterschied zwischen den verletzten und den unverletzten Drüsenschläuchen sofort ins Auge springt (Abb. 72). Es finden sich in der embryonalen und in der erwachsenen Schilddrüse in der Gewebezüchtung Mitosen. Im erwachsenen Gewebe, das nicht gezüchtet worden ist, hat man bis jetzt noch keine Mitosen gefunden. Mitochondrien, siderophile Körnchen und Fettkörner existieren noch länger, aber nicht mehr polar angeordnet in der Zelle. Das Bindegewebe, das nach Champy durch das sehr starke Wachstum des Epithels in einem Zustand der Hemmung gehalten ist, also nicht wachsen kann, wird durch die sich ausbreitenden Epithelien stark zusammengedrängt, an Stellen aber, an denen das Epithel fehlt, finden sich die üblichen Bindegewebszellen. Nach einigen Tagen aber sind die Drüsenzellen entdifferenziert, sie haben nach Champy keinen bestimmten Charakter. Ihre Form ist eher von dem Milieu als von der genetischen Potenz abhängig. Sie teilen sich lebhaft nahe an der Oberfläche des Plasmas.

Wir beschränken uns hier nur auf das Studium der Schilddrüse, die verglichen mit der Niere ein einfach gebautes Organ ist und sich verhältnismäßig unkompliziert in dem Kulturmedium verhält. Die Niere, sobald sie schon embryonal wirklich funktionell Niere ist, macht tiefgreifende Veränderungen als embryonales und erwachsenes Organ durch, deren Beschreibung aber hier zu weit führen würde. Sie ist ein hoch differenziertes Organ, das ganz im Dienste der Funktion steht und einseitig differenziert ist, wie es auch die Regeneration der verletzten Niere zeigt. Dagegen steht die Schilddrüse auf einer tieferen Stufe, gemessen an der Schnelligkeit und Langsamkeit, mit der sich die Zellelemente sowohl der embryonalen als auch der erwachsenen Drüse an die Gewebezüchtung anpassen. Denn die embryonale Schilddrüse zeigt die gleichen Vorgänge, welche sich in der Thyreoidea des erwachsenen Tieres abspielen, nur sind die Abbauerscheinungen nicht so zahlreich; sonst gehen die eben beschriebenen Vorgänge, ganz verschieden von den in der Niere stattfindenden Vorgängen, sowohl im embryonalen wie auch im erwachsenen Gewebe vor sich.

Je höher differenziert eine Zelle ist, je einschneidender sind die Änderungen, unter welchen sich der Abbau, der in der Bildung von Zellformen gipfelt, die in dem Kulturmilieu weiter leben können, im Medium sich abspielt, bis er wie bei Sinnesepithelien oder Nervenzellen kaum oder selten mehr vor sich geht.

Nicht nur die Schilddrüse, sondern auch die Prostata des erwachsenen Meerschweinchens funktioniert nur 2 Tage in der Gewebezüchtung. Sie erzeugt also kein neues Sekret. Um das nachzuweisen (22. Übung), verfahre man auf folgende Weise:

Man pflanze wie üblich kleine Stückchen Prostata in arteigenes Plasma und setze sich eine Serie Kulturen, die man am ersten Tage, eine Serie, die man am zweiten Tage, eine dritte Serie, die man am dritten oder vierten Tage benutzen will, an. Ehe man die Kulturen ansetzt, entnehme man etwas Samenblasenflüssigkeit, verdünne diese mit Ringerscher Lösung und bringe sie dann mit kleinen Stückchen Prostata eines Meerschweinchens zusammen. Nach kurzer Zeit koaguliert die Flüssigkeit. Züchtet man Prostatagewebe, wie schon gesagt, in arteigenem Plasma, so beobachtet man am ersten und zweiten Tage noch dieselbe Reaktion in der Samenblasenflüssigkeit. In den Kulturen, die man erst am dritten oder vierten Tage beobachtet, ist sie verschwunden. Ein am vierten Tage der Züchtung beobachtetes Prostatastück ist lebend, seine Zellen vermehren sich. Die feinen Körnchen, die der normalen Prostata eigen sind, sieht man nicht mehr. Die Kulturen haben dann ein Aussehen, wie solche Kulturen, in denen Bindegewebe und Epithel gemeinsam gezüchtet werden.

Das sich die Geschlechtszellen, soweit sie schon in die Spermienbildung eingetreten sind, diese zwangsläufig beenden, ist schon von Sundwall, Champy, M. Lewis in den verschiedensten Medien beobachtet worden, aber erst Goldschmidt hat gezeigt, wie die Ergebnisse, die durch die Lebendbeobachtung der Hodenzellen in dem Kulturmedium gewonnen sind, fruchtbringend verwertet werden können. Ich halte es für verfrüht, alle möglichen Gewebe zu züchten, wenn man nicht ein bestimmtes Problem lösen will, das nur mit Hilfe der Züchtung des einen, *betreffenden* Gewebes gelöst werden kann. Die Schätzung der Methode der Gewebezüchtung leidet, wenn planlose Versuche an allen möglichen Geweben angestellt werden. Das Experimentieren mit Insekten empfiehlt sich, da hier durch die Arbeiten der Forscher genau die zytologischen Stadien, besonders der Geschlechtszellen der Insekten bekannt sind. Wenn man gerade Material hat, so studiere man also noch den *Schmetterlingshoden* in vitro, und zwar nach den Angaben von Goldschmidt. Goldschmidt wählte die Puppe von Samia cecropia, die sich ihrer Größe wegen zu diesen Versuchen gut eignet. Wir nehmen, falls diese nicht erhältlich, eine der größeren einheimischen Puppen und betten sie ventralwärts in ein Schälchen mit mit Vaselin, nachdem man die Puppe mit Alkohol abgewaschen und leicht narkotisiert hat. Mit einer feinen aber starken Capillarpipette ziehe man aus dem Herzschlauch die Lymphe, nachdem man vorsichtig ein kleines Fenster in den Chitinpanzer geschnitten hat (23. Übung). Die

gewonnene Lymphe wird in eisgekühlte Gefäße getan, zentrifugiert und dann in eisgekühlten Gefäßen aufbewahrt. Es ist dringend darauf zu achten, daß kein Darminhalt die Lymphe verunreinigt, da sonst die Lymphe schwarz wird. Es empfiehlt sich auch, mit Glasmessern und -nadeln, statt mit Metallinstrumenten zu arbeiten. Man bereitet sich zum Auswaschen des Hodens Ringersche Lösung nach Clark, die folgende Zusammensetzung hat:

Clarksche Lösung:	NaCl	0,65%
	KCl	0,014%
	$CaCl_2$	0,012%
	NaH^2CO_3	0,01%
	Na_2HPO_4	0,001%

Hierauf entnimmt man steril die beiden oder das eine Hodenbläschen der Puppe. Die Hodenbläschen haben gewöhnlich eine sehr starke

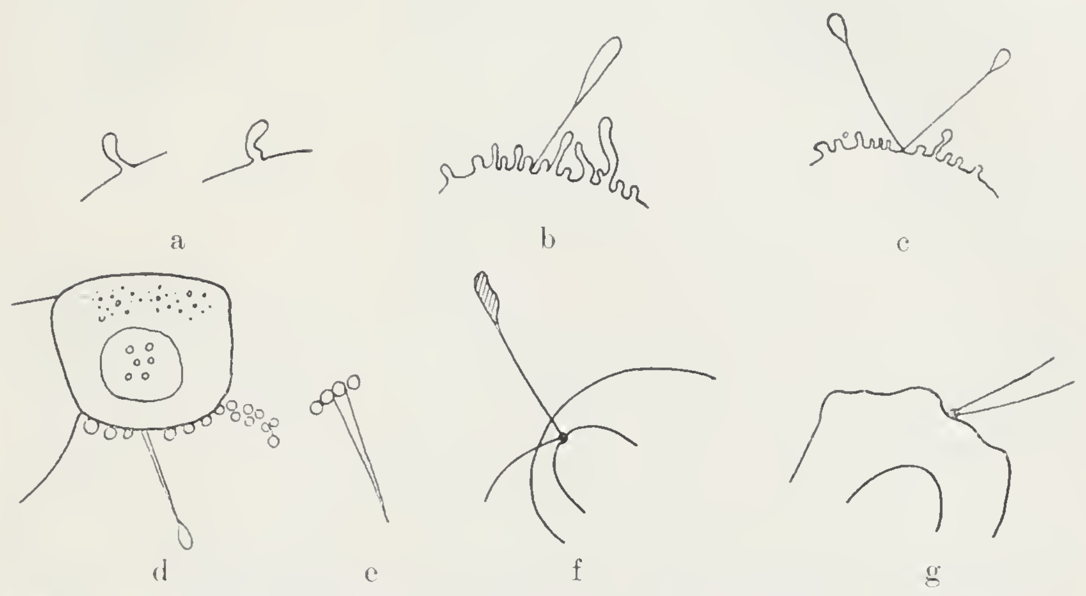


Abb. 73, a—g. Nacheinanderfolgende Stadien der Achsenfadenbildung in der jungen, lebenden Spermatocyte. Nach Goldschmidt 1917. Arch. f. Zellforschung, Band 14. Beschreibung siehe Text.

Membran und sehen bei manchen Formen grünlich aus. Beim Präparieren kann man entweder die schon benutzte oder eine neue Puppe nehmen. Man öffne ventralwärts die Leibeshöhle in der Nähe des 13. bis 16. Abdominalringes, lege den Inhalt der Körperhöhle vorsichtig beiseite und ziehe dann mit der Pinzette das Hodenbläschen an seinem Ausführungsgange heraus. Man wasche es in Ringerscher Lösung gehörig ab, öffne es und setze Kulturen mit der Lymphe oder in Ringerlösung in der üblichen Weise an. In der Lymphe durchlaufen die Spermatogonien alle Stadien der Spermienbildung, die gut im Leben zu studieren sind, in ungefähr 3 Wochen. Sind aus irgendeinem Grunde die Geschlechtszellen gestorben und nur die Follikelzellen lebend erhalten, so wachsen diese sehr stark, während in Kulturen, in welchen die Geschlechtszellen noch leben, die Follikelzellen in bescheidenen Grenzen gehalten werden. Es besteht hier also eine gegenseitige Beeinflussung zwischen den Zellen bindegewebiger und den Zellen epithelialer Natur.

Will man die Entstehung der Achsenfäden näher studieren, so wähle man sich junge Spermatocyten zur Beobachtung aus, wie sie sich in jedem Hoden finden. Die Achsenfäden der Spermatozoen erscheinen schon vor den Reifeteilungen in der Zelle und werden dann mit dem Zentrosom fertig vorgebildet auf die Tochterzellen verteilt. In den jungen Spermatocyten beginnt, wenn die Zelle zur Achsenfadenbildung schreitet, die dem Follikelraum zugekehrte Zelloberfläche sich mit zahlreichen Zotten zu bedecken (Abb. 73a). In Abb. 73b sind schon viele Zotten zu sehen, eine davon, die nicht gebogen ist, wächst dann völlig starr aus. Auf Skizze d, e sind die Formveränderungen des Auswuchses



Abb. 74 a u. b. Ausbildung der typischen Spermienbündel in dem mit Spermatiden ausgekleideten Follikel. a zeigt die noch aufgeknäuelten Achsenfäden. b die in die Follikelhöhle ausgestreckten Achsenfäden der Spermatiden. Nach Goldschmidt, wie Abb. 73.

in einem 15minutigen Zwischenraum skizziert. Bei e hat sich in derselben Zelle noch ein zweiter starrer Fortsatz mit einem Protoplasmakügelchen gebildet. In diesem Zustand verharrt die Zelle. Dann verlieren die Pseudopodien ihren Charakter. Sie fließen ab. und der starre Achenfaden bleibt mit Zentrosom, das hier lebend zu beobachten sein soll, übrig. Jetzt werden die Achsenfäden immer länger, bis sie das Follikellumen ganz ausfüllen (Abb. 73 f, g).

Will man diesen normalen Verlauf abändern, so nimmt man nach Goldschmidt eine Ringerlösung nach Vernon, die folgendermaßen zusammengesetzt ist: NaCl 0,75; $NaHCO_3$ 0,01; $CaCl_2$ 0,024; KCl 0,021%.

Die eben beschriebenen Vorgänge traten dann schon in den Spermatogonien auf. Die Entwicklung einer Ursamenzelle zu einem Spermatozoen ist also nach Goldschmidt eine zwangsläufige physikalische Reaktion, an der zwei Komponenten beteiligt sind. einmal die Follikelmembran, die die spezifischen osmotischen Verhältnisse schafft, die an jedem Punkt der Spermiogenese einwirkend gemacht werden können und die Zusammensetzung des Plasmas selbst.

Von den Zellen des menschlichen Gewebes an bis zu den Protozoenzellen hat man versucht, die Methode der Gewebezüchtung auszuwerten. Am besten erforscht sind die Frosch-, Hühner-, Meerschweinchen- und Kaninchengewebe. Es wird sich also empfehlen, daß Anfänger nur Arbeiten mit Tierarten vornehmen, die schon durch-

studiert sind. Aber selbst die Gewebe der erwähnten Tierarten sind nicht alle gleichmäßig durchforscht. So sind erst die bänderartigen breiten Zellen, die aus dem endodermalen Darm des Huhnes auswachsen, sehr spät als sympathische Nervenfasern erkannt worden. Es sollen also vom Anfänger zuerst noch keine Gewebe mit sehr gemischter Zusammensetzung zu züchten versucht werden, sondern das embryonale Herz, Unterhautbindegewebe und Epithelgewebe als die am besten durchforschten, sollten zuerst studiert werden.

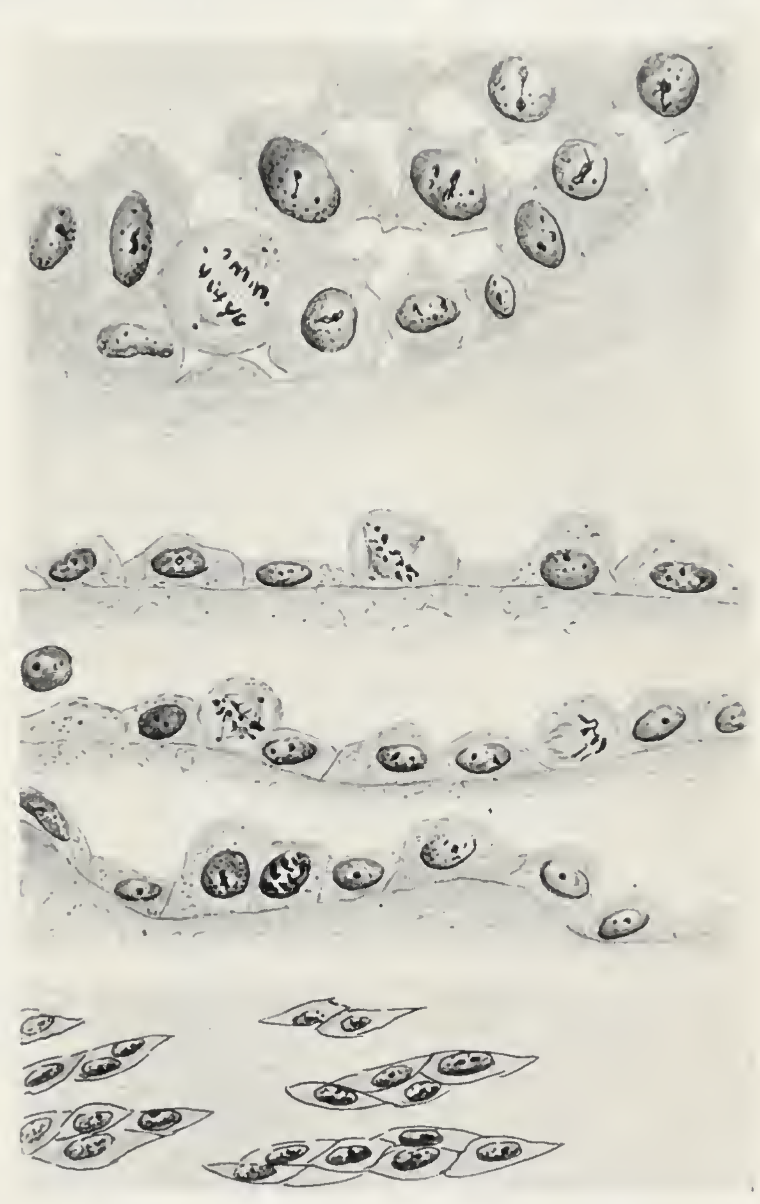


Abb. 75. Schematische Darstellung sog. entdifferenzierter Zellen verschiedenen Ursprunges. Nach Champy, 1914, La presse médicale.

Erst am Schlusse des Abschnittes also werden wir folgende Übung anstellen (24. Übung), um nachzuprüfen, ob Champy recht hat, wenn er behauptet, daß Zellen, seien sie bindegewebiger, seien sie epithelialer Herkunft in der Gewebezüchtung nach längerem Verweilen sich sehr ähnlich werden (Abbildung 75).

Wir nehmen also einen ungefähr zehntägigen Hühnerembryo und legen gleichzeitig Kulturen der Haut, der Milz und der embryonalen Niere, der Schilddrüse und des Hodens an, und zwar in reinem Hühnerplasma. Jeden Tag wechseln wir das Nährmedium, nachdem wir das Gewebe in Hühnerserum ausgespült haben. Dies wird 3 Tage fortgesetzt, dann eingebettet, gehärtet und geschnitten, darnach gefärbt nach Champy und Prenant (Siehe Seite 64). Dann wird sich zeigen, ob und welche Gewebearten sich entdifferenziert haben und sich ähnlich geworden sind. Es ist notwendig, daß der ganze Plasmatropfen gehärtet wird, damit die in das Plasma eingewanderten Zellen mit geschnitten werden. Für das Epithel steht es beim Huhn jedenfalls fest, daß es sich nicht in der Gewebezüchtung nach Form und Struktur so stark verändert, als man es nach Champys Angaben

glauben sollte. Auch LEVI glaubt nach seinen Erfahrungen beim embryonalen Gewebe nicht, daß die schon funktionierende Herzmuskulatur sich stark verändert.

Hierauf schreite man zum zweiten Teile der Übung und wiederhole die Reihe der Anordnung für die betreffenden Gewebe des erwachsenen Kaninchens. Hier müssen dann nach CHAMPY die in das Plasmedium eingedrungenen Zellstränge eine so starke Veränderung der Struktur ihrer Zellen erfahren haben, daß die verschiedenen Gewebe nicht mehr leicht voneinander zu unterscheiden sind. Hierbei stoßen wir schon auf unentschiedene Fragen. Es wird im Laufe der nächsten Jahre geklärt werden müssen, welche Gewebe bei Kaltblütlern und bei Warmblütlern in der Gewebezüchtung ihre Ausgangsstruktur erhalten und welche nicht.

IV. Ablauf progressiver und regressiver Vorgänge.

A. Verhalten der Sinnesepithelien in dem Kulturmedium.

Es ist mehrfach schon darauf hingedeutet worden, daß die Züchtung der Epithelien wenig geübt worden ist. Die Sinnesepithelien machen



Abb. 76. Schematische Darstellung einer Zelle des Pigmentepithels der Retina. Sämtliche Typen der Pigmentgranula sind gezeichnet. Die feinen Fäden sind die Mitochondrien. Die gestrichelten Granula stellen die grauen Pigmentgranula vor, während die schwarzen und umränderten Stäbchen die verschiedenen Größen und die verschiedenen Gestalten der farblosen und der schwarzen Pigmentgranula zeigen sollen. Nach Smith. 1920, Johns Hopkins Hosp.-Bull. Bd. 31.



Abb. 77a. Pigmentepithelzellen von Rana pipiens. Nach Uhlenhuth. 1916, Journ. of experim. med. Bd. 24.



Abb. 77b. Eine andere Pigmentepithelzelle, die sich langsam in dem Medium vorschiebt, mit vollständiger Gestaltveränderung, wie Abb. 77a.

aber eine Ausnahme, obgleich es sich gezeigt hat, daß die Pigmentzellen der Retina embryonal und erwachsen sich nicht in der Gewebekultur teilen, lebend im Medium bleiben und nur eine Umordnung der Pigmentgranula zeigen. Um diese Änderung der Polarität der Pigmentgranula darzustellen, verfahre man in folgender Weise:

Man stelle sich Froschplasma und Augenkammerwasser her und lege sich Kulturen des Retinapigmentepithels und des Irispigmentepithels des erwachsenen Frosches an. Zum Vergleich explantiere man kleine Stückchen des Retinaepithels eines Hühnerembryos vom Alter von 5—15 Tagen entweder in Loke-Lewis-Lösung oder in Plasma. Man wende bei diesen Präparaten bei späterer Beobachtung bei einigen Explantaten Mitochondrien- und Neutralrotgranulafärbung wie beschrieben an.

Pigmentzellen der Retina (s. Abb. 80). Die Pigmentzellen strecken zuerst feine Protoplasmafortsätze ins Medium, die keine Pigmentgranula enthalten, später reichen die Zellen einzeln oder in syncytialem Zusammenhang schleierartig hervor. Die Granulaarten in dieser Zellform sind verwirrend. Wir sehen stäbchenartige, schwarze oder braune Pigmentgranula, graue als Vorstufen der Pigmentgranula von manchen Autoren gedeutet, Mitochondrien und Neutralrotkörner. Die Pigmentgranula wandern



Abb. 78, a u. b. Zwei sich bewegende Irispigmentzellen in einem halbfesten Medium. a ist 11 Tage nach der Explantation gezeichnet, b 12 Tage. Nach Uhlenhuth, wie Abb. 77.

in den Zellen in bestimmten Bahnen von der Peripherie der Zelle bis zum Kern, und bis fast zum entgegengesetzten peripheren Rand, aber ein Bezirk der polar angeordneten Zelle bleibt frei von Pigmentkörnern (25. Übung).

Beim Huhn geht die Polarität, die diesen Zellen eigen ist, nicht ganz bei der Züchtung verloren. Dagegen sind die jetzt zu studierenden Zellen des Pigmentepithels der Iris und der Retina vom Frosch stärkerer Umordnungserscheinungen fähig. Die pigmentierten Zellen des Retinaepithels, die polar gebaut sind, grenzen mit der pigmentierten Basis an die Retina (Abb. 77, a b). In dem Teil sind gelbe Ölkugeln vorhanden. Die Zelle verliert in der Gewebekultur die ihr zukommende Differenzierung in zwei verschiedene Abschnitte und beide Pole der Zelle werden einander gleich. Ebenso verschwindet das Pigment und die strukturellen Anhänge. Die Zelle nimmt die Form einer Bindegewebszelle an und bleibt nicht mehr hexagonal. Auch für die Pigmentzelle der Iris gilt das gleiche. Alle strukturellen Verschiedenheiten verschwinden (Abbildung 78 a. b), die Zellen werden beweglich und spindelförmig. Die beiden Zellarten werden in dem halbflüssigen Kulturmedium einander ähnlicher und nehmen bis zum gewissen Grade die gewöhnliche Form der Bindegewebszellen an. Die Retina selber hat sich stärker hierbei abzubauen wie die Iriszellen. Aber zu einer Teilung kommt es bei dieser Zellgruppe nie in dem Explantat, dagegen fällt die starke Mitosenbildung der bindegewebigen MÜLLERschen Faser auf. Hier (Abb. 79) zeigen sich die gleichen Erscheinungen wie in der Muskulatur der Blase (vgl. S. 67). Auch die Pigmentzellen der Chorioidea verhalten sich in der Kultur bindegewebeartig (Abb. 78 c). Beide Zellgruppen sind im gleichen Medium und verhalten sich doch so verschieden. Es müssen besonders hier doch inhärente Unterschiede der Zellen bestehen, die in ihnen fest verankert sind.



Abb. 78 c. Chorioideazelle und Mesenchymzelle des 12tägigen Hühnerembryos. 12 Stunden in der Kultur. Nach Luna, 1919, Arch. ital. di anat. e di embriol. Bd. 18.

Damit diese beiden geschilderten pigmentierten Zellarten sich ähnlicher werden können, muß die pigmentierte Retinazelle größere regressive Veränderungen durchmachen als die pigmentierte Iriszelle. UHLENHUTH macht für die pigmentierte Retinazelle geltend, daß diese Zelle jetzt von einem allseitig gleichmäßig wirkenden Medium umgeben sei, während sie sonst an den entgegengesetzten Polen verschiedenen Einflüssen unterworfen war.

Beim Hühnerembryo ist dies nicht so stark ausgeprägt, wie wir gesehen haben (Abb. 80 u. 81). Doch wird sich gerade mit Hilfe der

Abb. 79 a u. b. Müllersche Fasern des Schildkrötenauges. 7 Tage gezüchtet. Links: Schnitt; rechts: Einzelne isolierte Fasern sind zusammengestellt, um den progressiven Abbau der Müllerschen Fasern zu zeigen. Nach Champy, 1914, Arch. de zool. exp. et gén. Bd. 53.

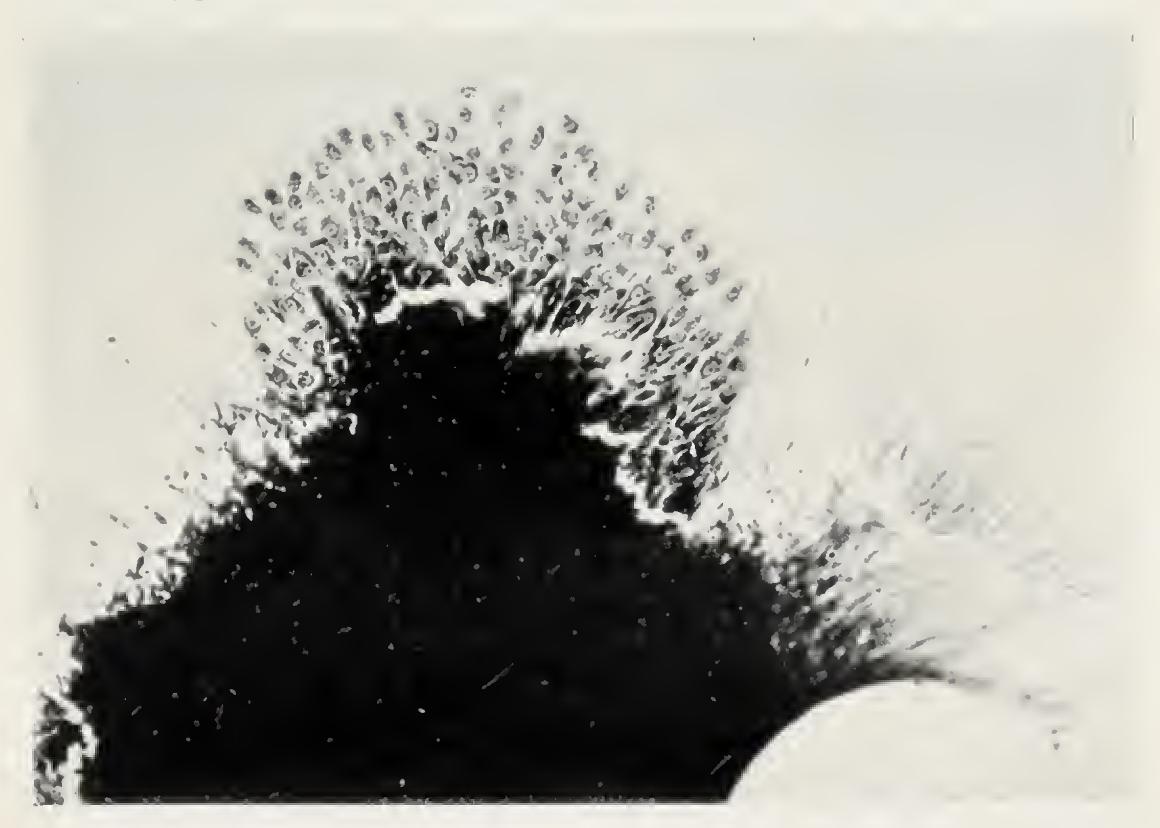


Abb. 80. Photogramm einer 72 Stunden alten Kultur der Pigmentschicht der Retina von einem 8 Tage alten Hühnerembryo in Locke-Lewis-Lösung. Sowohl Pigmentzellen als auch Mesenchymzellen sind erkennbar. Nach Smith, Abb. wie 76.

Gewebezüchtung die schwebende Frage, ob die Mitochondrien sich in Pigment umwandeln können, lösen lassen. (Vgl. das Schema Abb. 76.)

Bis heute sind drei Ansichten vorhanden, wie die Pigmentgranula entstehen können. Sind sie Produkte des Zellkerns, der Mitochondrien, des durch Enzyme umgewandelten Zellplasmas?

Die interessantesten und für theoretische Entscheidungen wichtigsten Aufschlüsse werden wir durch die Züchtung der Epithelzelle, die

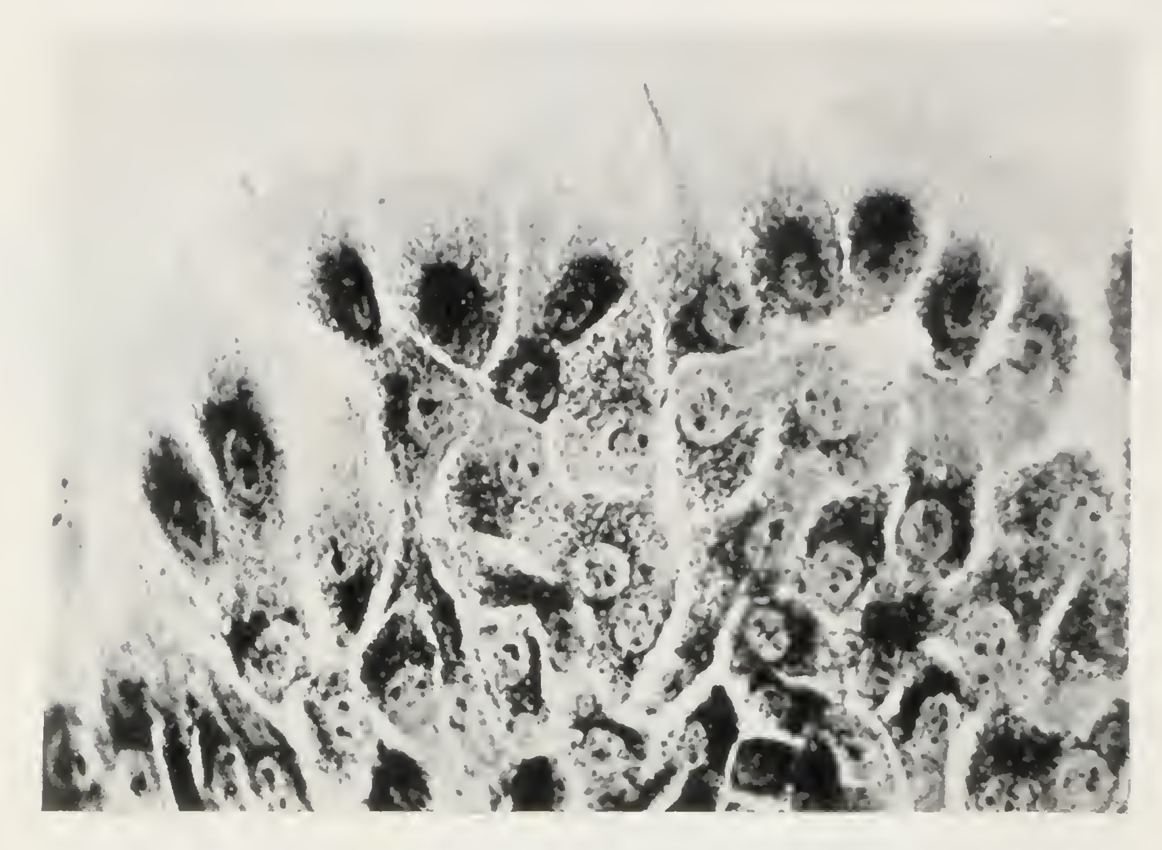


Abb. 81. Das gleiche Präparat, aber stärker vergrößert. In den meisten Zellen sind die Pigmentgranula um die Zentrosphäre angeordnet an der einen Seite des Kerns. Nach Smith, wie Abb. 76 u. 81.

schon im normalen Leben an verschiedene Medien grenzt, sei es Körperflüssigkeiten und Bindegewebe, sei es Außenwelt und Gewebe, erhalten. Ihr ist eine große Gestaltungsmöglichkeit gegeben. Sie hat die verschiedensten Anhänge, Flimmerhaare, Bürstenbesätze usw., und Inhaltskörper, wie Pigmentkörner und Granula mannigfaltiger Art. Es ist ihr eine ausgesprochene Individualität eigen, daß sie fester organisiert erscheint, wie die schon im Körper potenzenhaltige Bindegewebszelle.

B. Verhalten der nervösen Elemente.

Das zweite Übungsgebiet dieses Abschnittes umfaßt die Erscheinungen, die in dem gewählten Medium in Zellen und Strukturen des Nervengewebes vor sich gehen. Früh ist das embryonale Nervengewebe studiert, ja nur dem Wunsche HARRISONS, die Streitfrage experimentell zu lösen, ob die Nervenfasern Produkte der Ganglienzellen sind oder vom umgebenden Plasma erzeugt werden — eine Frage, die noch vor 25 Jahren zur Klärung stand — verdanken wir, überhaupt einen versprechenden Anfang der Methode der Gewebepflege zuerst bei Kaltblütlern (Froschlarven) und später durch BURROWS bei Warmblütlern (Hühnerembryo). Die Methode wurde

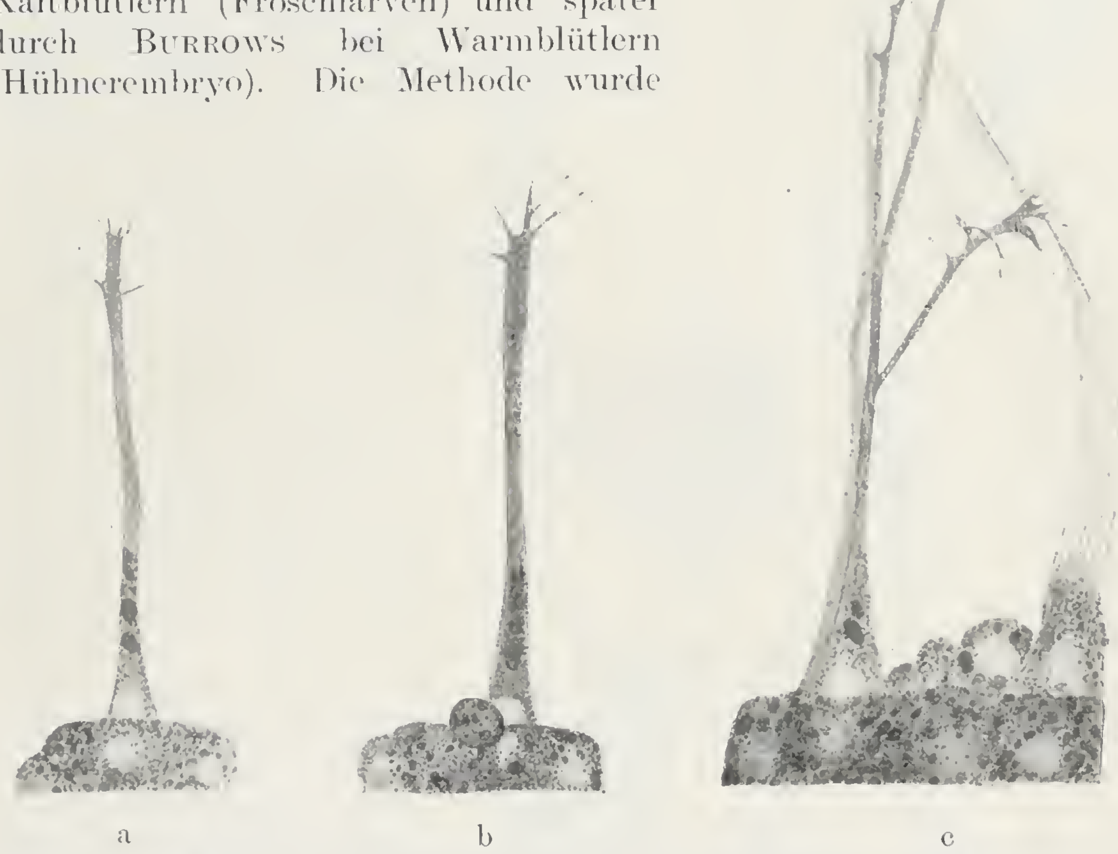


Abb. 82, a—c. Kultur aus dem Medullarrohr des embryonalen Frosches. Entstehen von Ausläufern der Ganglienzellen und die Verbindung mit anderen Zellen im Gewebe, fünf nacheinanderfolgende Stadien desselben Nervenkomplexes. a 24 Stunden, b 25½ Stunden, c 34 Stunden nach der Explantation. Nach Harrison, 1913, Transact congr. Americ. Phys. and Surg IX.

aber erst durch die Plasmagewinnung, die BURROWS und CARREL vervollkommneten, weiteren Kreisen beachtungswert. Um das Auswachsen der Nervenfasern unter dem Deckglas zu beobachten, wird es sich empfehlen, entweder Froschembryonen oder Hühnerembryonen zu benutzen (26. Übung). Man wählt nach HARRISON Stadien der Embryonalentwicklung des Frosches, bei denen manche Zellen des Medullarrohres noch keine Fortsätze haben. Man überzeugt sich durch einen Gefrierschnitt oder durch einen Schnitt mit dem Rasiermesser unter dem Mikroskop nach Methylenblaufärbung, wie viele Ganglienzellen des Medullarrohres schon Fortsätze gebildet



Abb. 82 d. Kultur aus dem Medullarrohr des embryonalen Frosches. Entstehen von Ausläufern der Ganglienzellen und die Verbindung mit anderen Zellen im Gewebe. 4. Stadium desselben Nervenkomplexes. 46 Stunden nach der Explantation. Nach Harrison, wie Abb. 88.

haben. Dann trennt man das Medullarrohr von den anderen Geweben des Körpers und teilt es in Stückchen, die mit dem Binokular auspräpariert worden sind. Nun sind sie fertig zum Einsetzen in das Kulturmedium. Die Stückchen müssen sehr klein sein. Harrison, der zuerst diese Experimente gemacht hat, hat die Stückchen in Froschlymphe gezüchtet. Wir wollen aber aus technischen Gründen nicht dieses für Nervengewebe historisch älteste Medium zur Züchtung benutzen, sondern wir stellen ein Medium aus Froschplasma und Augenkammerwasser her.

Schon nach kurzer Zeit sieht man Lebensäußerungen der Zellen. Eine ganze Reihe von Zellen umgeben jetzt das eingepflanzte Stück und bilden schleierartige Gewebsinseln. Nach 48 Stunden aber werden die Gewebsschleier durch die Verflüssigung des Plasmas zerrissen und hier und da bilden sich von Zellen freie Räume. Da man im allgemeinen nicht allein Nervengewebe explantiert hat, so ist es wichtig, zu wissen, daß sowohl die embryonale Muskelzelle als auch die Epidermiszelle der Froschlarve sich in dem gewählten Medium differenzieren. Die Muskelzellen der Froschlarve erwerben Querstreifung, die Epithelzellen Cilien, auch wenn diese Zellen von ihrem Mutterboden getrennt sind.

So kann es nicht erstaunen, wenn die Ganglienzellen nach 24 Stunden dichte plasmatische Fortsätze aus dem Zellschleier hervorstrecken. 10 Stunden später hat sich dieser Auswuchs meßbar verlängert und in vier getrennte Fasern geteilt. Immer länger streckt sich nun der Auswuchs, bis er schließlich über 1 mm lang geworden ist. Das Ende jeder Faser zeigt fingerförmige unregelmäßige Pseudopodien, die in ständiger Bewegung sind. Sie bestehen aus amöboiden Protoplasma, welches von der Ursprungsstelle stammt. Diese Endbäumchen der Fasern oder Plakoden sind die Bewegungsmittel der Nervenzelle. Das Plasma wird ungefähr im Zeitraum von 1 Minute 1 μ weit vorgeschoben, und die Zelle rückt entweder nach oder die Faser wird stark gestreckt (Abb. 82).

Diese schon im Jahre 1904 von Harrison gefundenen Ergebnisse sind von vielen Forschern bestätigt und erweitert. Ich erwähne nur hier die Arbeiten von Braus.

Hat man keine Froschembryonen, so empfiehlt es sich, Hühnerembryonen zu verarbeiten. Das Rhombencephalon eines viertägigen Hühnerembryos eignet sich besonders gut zum Ansetzen von Kulturen. Hierbei ist äußerste Schnelligkeit nötig und es



Abb. 82 e. Kultur aus dem Medullarrohr des embryonalen Frosches. Entstehen von Ausläufern der Ganglienzellen und die Verbindung mit anderen Zellen im Gewebe. 5. Stadium desselben Nervenkomplexes. 58 Stunden nach der Eplantation. Diese Abbildung ist weniger stark vergrößert wie die vier vorigen. Nach Harrison, wie Abb. 82.

empfiehlt sich nicht, das excidierte Stückchen erst in Waschflüssigkeiten zu bringen, sondern man zerteilt das Gewebe schnell in einem trocknen sterilen Glasschälchen und bringt es in das Kulturmedium. Levi hat besonders gute Erfolge durch diese Methode erhalten und auch die Bildung von Endbäumchen, auch Faserverflechtungen und das selbsttätige Auswandern von Ganglienzellen gesehen. Er betont, daß die Lebensdauer einer Kultur höchstens 24—48 Stunden beträgt. Man sieht also daraus, daß von einem eigentlichen Wachstum der Warmblütler-Nervenfaser nicht die Rede sein kann. Die Lebenserscheinungen bestehen nur in der Umgruppierung des Zellplasmas, das sich in der explantierten Ganglienzelle schon befindet.

Abb. 83. Ganglienzelle, die sich aus dem Verbande der übrigen Spinalganglien freigemacht hat und große Fortsätze in das Medium streckt. Vier Tage alte Kultur aus den Spinalganglien eines 7 Monate alten Kaninchen. Nach dem Leben. Nach Ingebrigtsen. 1913, Journ. of experim. med. Bd. 17.

Ingebrigtsen züchtet Nervenfasern aus Spinalganglien des Kleinhirns einer eben geborenen Katze (s. Abb. 83). Hier fallen im gefärbten Präparat die vielen Gliafasern und die eine Nervenfaser auf (Abb. 86). Lebend läßt sich dieser Unterschied nicht leicht nachweisen. Ingebrigtsen hat Formalinfixierung, Held'sche Molybdän-Hämatoxylinfärbung mit nachfolgender Differenzierung in Weigertscher Flüssigkeit zur Darstellung seiner Präparate verwandt, doch war das Resultat nicht ganz befriedigend. Levi fixiert mit Zenker, dann in der Maximowschen Lösung

und färbt mit HELDschem Molybdän-Hämatoxylin. Er wäscht vor der Fixation mit RINGERscher Flüssigkeit aus. Wir gehen hier auf dies



Abb. 84. Fortsätze der Ganglienzellen und der Gliazellen aus einem Stückchen des Cortex eines 3 Wochen alten Hundes, 3 Tage im Medium. Nach Ingebrigtsen, wie Abb. 83.

schwierige Gebiet, das Wachstum der Glia- und Nervenfasern, nicht weiter ein, sondern studieren noch am lebenden Präparat die Bildung von A n a s t o m o s e n und Endverzweigungen der Nervenfasern nach G. LEVI.

Im Verlauf von zwei Stunden beobachtet Levi deutlich in arteigenem Plasma die Bildung von feinen Faserbrücken zwischen zwei parallel nebeneinander liegenden Fasern des Rhombenkephalons eines 3 Tage alten Hühnerembryos im Leben (25. Übung). In dieser aus dem Rhombenkephalon auswachsenden dicken Fasern laufen zuerst die Nervenstränge parallel. Diese dicke Faser streckt sich im Verlauf von 5 Stunden und wächst zu einem sehr langen Faden aus. Bei dem untersuchten Beispiel wachsen die beiden Äste des ursprünglichen Nervenstranges nicht mit gleicher Geschwindigkeit. Sie waren im Anfange gleich groß, am Schluß der Beobachtungszeit ist der eine doppelt so lang wie der andere (Abb. 85). In den schon gebildeten feinsten Fädchens des Endbäumchens bilden sich neue Fäserchen. Diese Fäserchen werden dann mit Plasma gefüllt, und es entsteht ein fächerartiges Gebilde, das sich später strecken und wieder neue Fasern aus sich herauswachsen lassen kann. So wiederholt sich das Spiel der Bildung von Endknospen oder Endplakoden fortwährend und dient dazu, die Nervenfasern zu verlängern. Auch kurze Neuriten, deren Verbindungen mit der Ganglienzelle noch sichtbar sind, verlängern sich auf diese Weise. Die Spinalganglien dringen aus dem Gewebe im allgemeinen als dicke, kräftige Zylinder zuerst heraus, in denen man die einzelnen Fasern deutlich unterscheiden kann. Im Verlauf von ungefähr 7 Stunden ist aus den kurzen Fortsätzen ein langes fädiges Gebilde entstanden, das an seinen Enden zahlreiche Verästelungen hat.



Abb. 85. Nach Levi. Anastomosen- und Plakodenbildung aus dem Rhombenkephalon eines jüngeren Hühnerembryos, 3 Tage gezüchtet. Nach Levi, 1917, Atti della R. Acad. dei Lincei. V. Serie, Bd. 12.

Um dies nachzuprüfen, beobachte man eine Stelle des Präparats fortgesetzt und zeichne sie in kurzen Zeitabständen. So sieht man,

daß eine Nervenfaser zuerst an ihrem einen Aste zahlreiche Endknospen hatte, die sich dann bald in ein Gewirr von vielen Fäden auflösen. Sehr häufig entsteht auch durch Bildung von freien Stellen aus einem Nervenplexus ein verzweigtes Fasergeflecht, das zahlreiche Anastomosen besitzt, also der früher die ganze Fläche ausfüllende Nervenplexus ist aufgeteilt in ein feinstes Gitterwerk. Wieder können sich diese Fasern zusammenschließen zu einem Nervenstrang und sich später wieder in feinste Fäserchen auflösen. Einzelne Neuroblasten können aus dem Plasma auswandern und neue Verzweigungen bilden. Es ist aber Vorbedingung, daß feine Verbindungen mit dem Ursprungsgewebe existieren, ist die Zelle vollständig getrennt, so stirbt sie nach kurzer Zeit ab. Es scheint also, als ob sie ihre Nahrung aus dem eingepflanzten Gewebe zieht.



Abb. 86. Auswachsen einer Faser aus dem Kleinhirn eines eben geborenen Meerschweinchens, 2 Tage alte Kultur. Gefärbtes Präparat, das den Unterschied zwischen Nervenfortsätzen und Gliafasern zeigt. Nach Ingebrigtsen. 1913, Journ. of exper. med. Bd. 18.

Es wird behauptet, daß das starke Lichtbrechungsvermögen die auswachsende Nervenfaser kenntlich macht. Ich möchte lieber raten, zum Einpflanzen nervöses embryonales Gewebe zu excidieren. Das ist bei der relativen Größe der Strukturen möglich.

Die in fixierten Präparaten erscheinende Gesamtheit der Fibrillen existiert nicht im Leben, doch sind lebend einzelne fibrilläre Fasern beobachtet worden.



Abb. 87. Auswachsende sympathische Nervenfaser aus dem Darmkanal eines 7täg'gen Hühnerembryos, 2 Tage in Loke-Lewis-Lösung. Nach Matsumoto, 1920, Johns Hopkins Hosp.-Bull. N. 349.

Zum Schluß fertigen wir uns noch Kulturen von den Darmschlingen des Hühnerembryos an (7 Tage alt). Aus ihnen wachsen breite Bänder in der Loke-Lewis-Flüssigkeit, schon in kurzer Zeit heraus. Diese zeigen Mitochondrien und Neutralrotkörner; es sind sympathische Nervenfasern (Abb. 87).

Die Hinfälligkeit der nervösen Elemente im allgemeinen ist groß, echtes Wachstum, manifestiert durch mitotische Teilungen, ist nicht beobachtet worden. So haben wir von den Mesenchymzellen des embryonalen Hühnerherzens bis zu den nervösen Elementen der Retina eine Reihe, die wieder die Abhängigkeit von Funktion und Zelldifferenzierung zur Potenzgröße zeigt. Je größer die funktionellen Ansprüche an eine Zelle sind, je differenzierter sie ist, je geringer ihre Umbildungsfähigkeit und Lebensdauer in dem Explantat. Je höher das Gewebe in der Wirbeltierreihe steht, je früher tritt schon diese Potenzbeschränkung ein, wie wir bei Frosch und Huhn sehen.

C. Verhalten des Herzklappengewebes.

Es ist schon seit Cohnheim strittig, ob alle bei der Entzündung erscheinenden Rundzellen der Pathologen lympho- oder leukocytären Ursprungs sind, oder ob das umgebende Bindegewebe Rundzellen ausschmilzt.

Die Herzklappe der erwachsenen Katze, Ratte oder Ringelnatter eignet sich zum Studium des Abbaues des Bindegewebes oder der elastischen Fasern, bei dem auch Rundzellen frei werden, wie schon lange von GRAWITZ betont. Man bereitet sich Ringelnatterplasma oder je nach Wahl Ratten- oder Katzenplasma vor (27. Übung). Bei der Zubereitung des Ringelnatterplasmas muß man besonders darauf achten, daß das Plasma selbst keine dem Blut vorher schon eigenen Bakterien enthält, da das Blut der wechselwarmen Tiere mit kommensalen Bakterien beladen ist, die dann natürlich bei der Plasmabereitung mit in das Plasma gelangen. Es empfiehlt sich also, gleich nach Bereitung des Mediums einen Ausstrich zu machen, um zu sehen, ob man veil oder wenig Bakterien im Plasma hat.

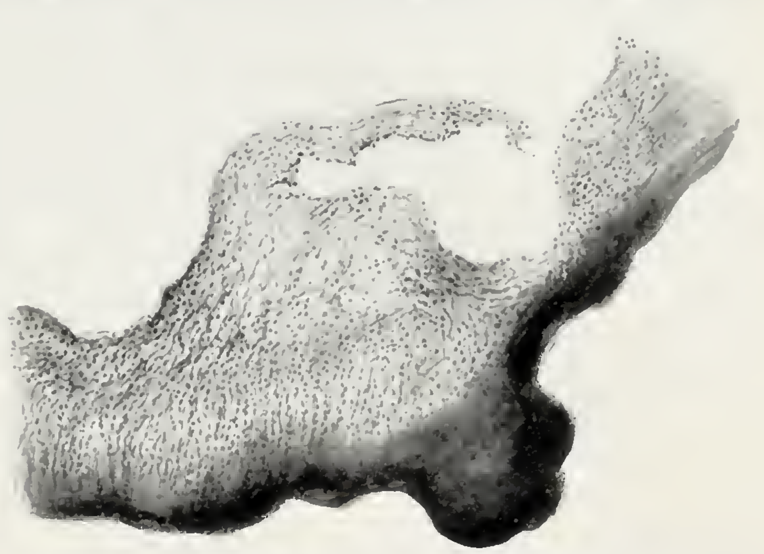


Abb. 88. Normale Herzklappe der Schlange. Zeigt den oberen, mit starken Bindegewebsfibrillen und elastischen Fasern versteiften Teil und den unteren schleierartigen Teil. Nach Erdmann 1921. Arch. f. Entwicklungsmech. d. Org., Bd. 48.

Das Herauspräparieren der Herzklappe ist nur unter der binokularen Lupe möglich. Man öffnet mit einem Sektionsschnitt das Herz sagittal und sieht dann die Mitralis unter der Lupe frei in das Lumen des Ventrikels hineinhängen. Sie ist durch ihre weißliche Färbung im Gegensatz zu dem rötlichen Herzgewebe kenntlich (Abb. 88). Man schneidet die Mitralis oder irgendeine andere Klappe an einer Ansatzstelle ab und zerteilt sie in RINGERscher Lösung in kleine Stückchen. Es empfiehlt sich, ehe man das Gewebe zerstückelt, die schleierartige Unterhälfte abzuschneiden und in einem besonderen Schälchen getrennt zu zerstückeln. Ebenso die steife, durch derbe Bindegewebsfibrillen gestützte andere Hälfte.

Man soll die Stücke mit der binokularen Lupe durchmustern und sehen, ob man nicht Stückchen der Herzklappe bekommen hat, in denen sich kleine Gefäße befinden. Diese müssen ausgemerzt werden, weil sie später bei der Deutung der Veränderungen nur Verwirrung anrichten könnten.

Man beobachte die Kulturen in Abständen lebend und konserviere nach 6, 18 oder 24 Stunden die Stückchen in Alkohol für elastische Faserfärbung, in ORTHschem Gemisch oder nach CARNOY für die anderen Färbungen. Die Lebendbeobachtung der Herzklappe zeigt dem ungeübten Beschauer nur wenig Veränderungen in den ersten Tagen, später aber sieht man mittelfeine und feine Fibrillen einen Schleier um das eingepflanzte Gewebestück bilden. Ihrem Lichtbrechungsvermögen nach sind sie elastische Fasern und lassen sich auch im Schnitt gut färberisch darstellen. In den ersten Tagen zeigen zur Kontrolle hergestellte Totalpräparate Auswanderung von runden Zellen. Bei günstiger Wahl kann



Abb. 89. Dasselbe Material 3 Tage bebrütet, zeigt die Auflockerung des Gewebes und die Füllung der Kerne mit Kernsaft. Nach Erdmann 1921, wie Bild 88.

man sehen, daß diese runden Zellen aus vorher langsam sich bewegenden Bindegewebszellen entstanden sind. Diese runden Zellen zeigen, daß sich die Kitt-, Bindegewebs- und elastische Substanz des eingepflanzten Stückes im Plasmamedium gelöst hat. Hierdurch werden die erwachsenen Bindegewebszellen frei und wandern langsam in das umgrenzende Plasmamedium. Durch die Auflösung der erwähnten Substanzen erscheinen große Vakuolen in dem eingepflanzten Stück (Abb. 89 u. 90). Die Veränderungen lassen sich gut an Schnittbildern nachweisen. Man sieht die Bindegewebszelle mit ihren langen derben Fortsätzen, die aus ihr herauswachsen, umgeben von Vakuolen, frei liegen. In manchen Zellen kann man ein amitotisches Zerbrechen der Kerne erkennen, aus denen höchstwahrscheinlich neue kleine, runde Zellen, die später reichlich im Präparat sind, gebildet werden. Letztere kann man besonders gut an Präparaten der Herzklappe der Ratte beobachten. Die runden, ausgewanderten Zellen differenzieren sich später wieder in Zellen (Abb. 91) mit präkol-

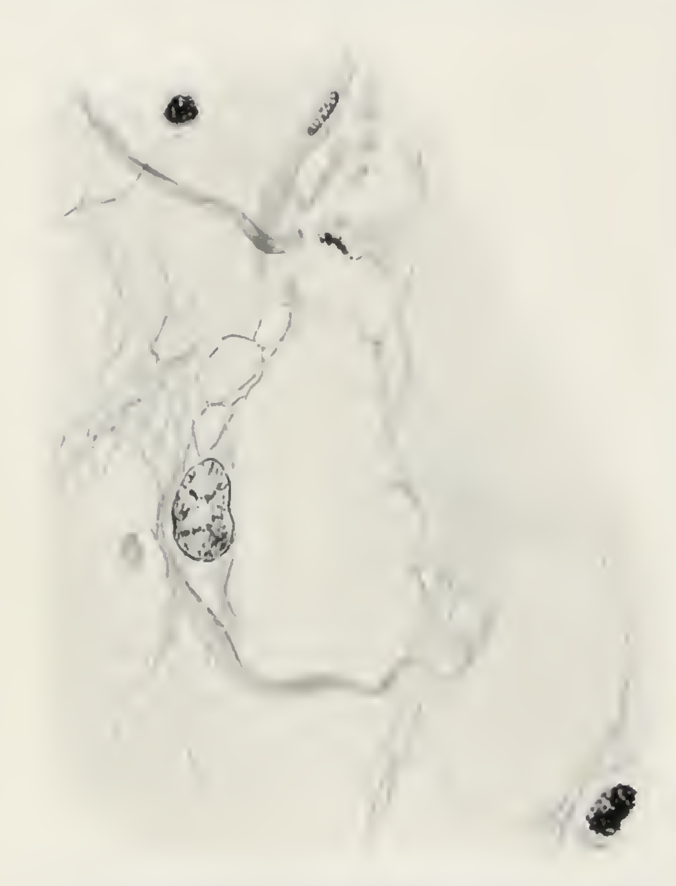


Abb. 90. Dasselbe Präparat bei stärkerer Vergrößerung. Nach Erdmann 1921, wie Bild 88, 89.



Abb. 91. In Plasma eingepflanztes Gewebestückchen der Herzklappe der erwachsenen Schlange nach 14 tägigem Verweilen im Plasmamedium. Man beachte den Unterschied zwischen den neugebildeten und den eingepflanzten lebenden Gewebsteilen. Nach Erdmann 1921, wie die vorigen Bilder.

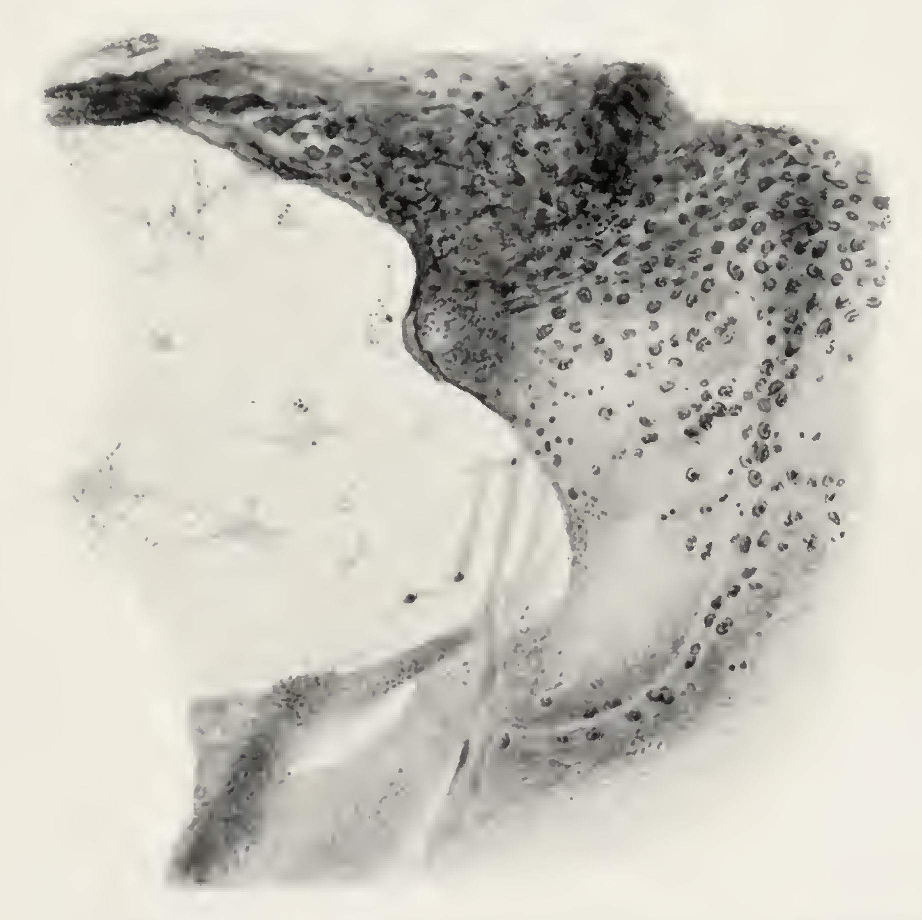


Abb. 92. Totalpräparat der Schlangenherzklappe. Zeigt die Erweichungsbahnen, 3 Tage gezüchtet. Nach Erdmann, wie die vorigen Bilder.

lagenen Fasern zurück. Da wir kein Diagnostikum haben, ob die Fibrillen bindegewebig oder elastisch sind, denn sie färben sich nicht bei den entsprechenden Färbungen, so können wir sie mit CHAMPY „präkollagen" nennen. Sie werden durch Färbung nach VAN GIESON gelblich gefärbt. Die präkollagene Substanz bildet wahrscheinlich die Matrix für kollagene und elastische Fasern.

Es zeigt sich also deutlich, daß das erwachsene Herzklappengewebe einschneidender Veränderungen, die als Ab- und Umbau gedeutet werden können, fähig ist. Man färbt die Schnitte, die man sich aus gezüchteten Stückchen vom 1, 2, 3, 4 usw. Tage hergestellt hat, mit Bindegewebsfärbungen (VAN GIESON) und elastischer Fasernfärbung bei der Schlange.

Blaue Elasticafärbung modifiziert für Herzklappen der Schlange.

Diese Färbung wird nur für Schnitte angewandt. Man bringt das Material, um es zum Schneiden vorzubereiten, in:

Alk. absol.	1—2 Stunden,
Chloroform	2 Stunden,
Chloroform-Paraffin	über Nacht,
weiches Paraffin	5—6 Stunden,
hartes ,, ...	1—2 ,,
darnach Einbetten in Paraffin.	

Die gewonnenen Schnitte werden vorgefärbt in Lithion-Karmin 24 Stunden; ausspülen in Aqua dest.; Nachfärbung in blauer Elasticafärbung 10—16 Stunden. Die Farbmischung bereitet man aus: 100 ccm Salzsäure-Alkohol + 5 ccm Fuchselin. Kurz differenzieren in Alkohol 96% und weiterführen der Präparate, wie bei den vorher beschriebenen Methoden angegeben.

V. Nutzbarmachung der Methode der Gewebezüchtung zur Lösung noch strittiger Fragen.

Mit Hilfe der Methode der Gewebezüchtung sind bis jetzt eine Reihe von Versuchen ausgeführt, die fest umschriebene biologische Fragen zu lösen versuchten. Es soll hier gesagt werden, daß besonders solche Probleme in Angriff genommen werden sollten, die nur mit Hilfe der Methode gelöst werden können. Stehen dem Experimentator andere Wege offen, so muß er natürlich diese auch gehen und erst als Ergänzung sich der Methode der Gewebezüchtung bedienen. Die Methode der Gewebezüchtung kann nur in eng umschriebenen Grenzen angewandt werden, sie ist kein Allheilmittel, um neue Ergebnisse zu finden und darf auch keine Modesache sein.

So erschien es sehr aussichtsreich, Tumorgewebe zu züchten. Trotz der Bemühungen vieler Forscher ist es noch nicht gelungen, Tumorgewebe jahrelang oder monatelang zu züchten, wie es bei der embryonalen Bindegewebszelle oder der embryonalen Epithelzelle möglich ist.

Man kann Tumormaterial bis jetzt nur einige Wochen züchten. Die Frage, die durch diese Versuche gelöst werden soll, ist die: Wie unterscheiden sich Tumorzellen und Stromazellen? Wie unterscheiden sich Sarkom- und Karzinomzellen in bezug auf ihre Potenzen?

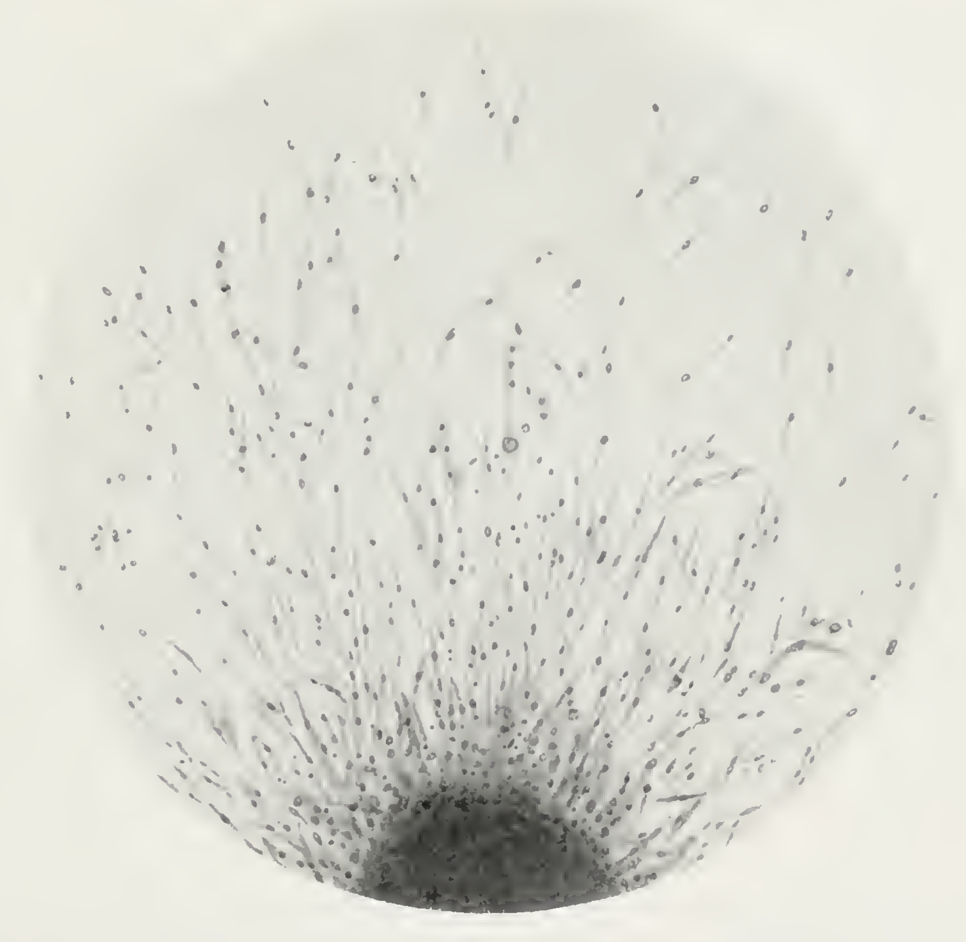


Abb. 94. Rattensarkomzellen, 3 Tage in Taubenplasma gezüchtet. Das Anfangswachstum im fremden Plasma nicht gestört, später zeigen sich Schädigungen. Nach Lambert und Hanes 1911. Journ. of exp. med. Bd. 14.

Hat man Tumormaterial irgendwelcher Art zur Verfügung, so empfiehlt es sich, auch dieses verschiedenen Züchtungsbedingungen zu unterwerfen. Es ist gerade von Tumorzellen behauptet worden, daß die Spezifität des Nährmediums bei ihnen nicht besonders ausgeprägt zu sein scheint. So wächst nach Thomson menschliches Karzinom in Hühnerplasma und Embryonalextrakt des Huhnes (vergl. auch Abb. 94, 95, 97). Mäusekarzinome und -sarkome sind fast immer in Rattenplasma gezüchtet worden, doch haben die Plasma-Medien bis jetzt sich sehr ungünstig für die Züchtung erwiesen, weil die Verflüssigung des Plasmas schon in wenigen Stunden bis zu einem Tage geschehen kann, so daß ein häufiges Wechseln des Mediums notwendig ist. Bei den von Thomson und Drew gebrauchten Medien soll das nicht der Fall sein. Wäre dies richtig, so würde eher der physikalische als der chemische Charakter des Mediums einen besseren oder schlechteren Erfolg bei der Züchtung verursachen. Doch wird stets Embryonalextrakt hinzugefügt.

Um Tumorkulturen anzusetzen, narkotisiere man schwach das betreffende Tier und nehme steril den Tumor heraus, spüle ihn in Ringer-

scher Lösung ab und schneide die weißlichen, nicht nekrotischen Teile für die Bearbeitung ab (28. Übung). Sie werden dann genau so, wie jedes andere Gewebe in kleine Stückchen zerteilt und in die betreffenden Medien getan. Es empfiehlt sich nicht, menschliche Tumoren, die

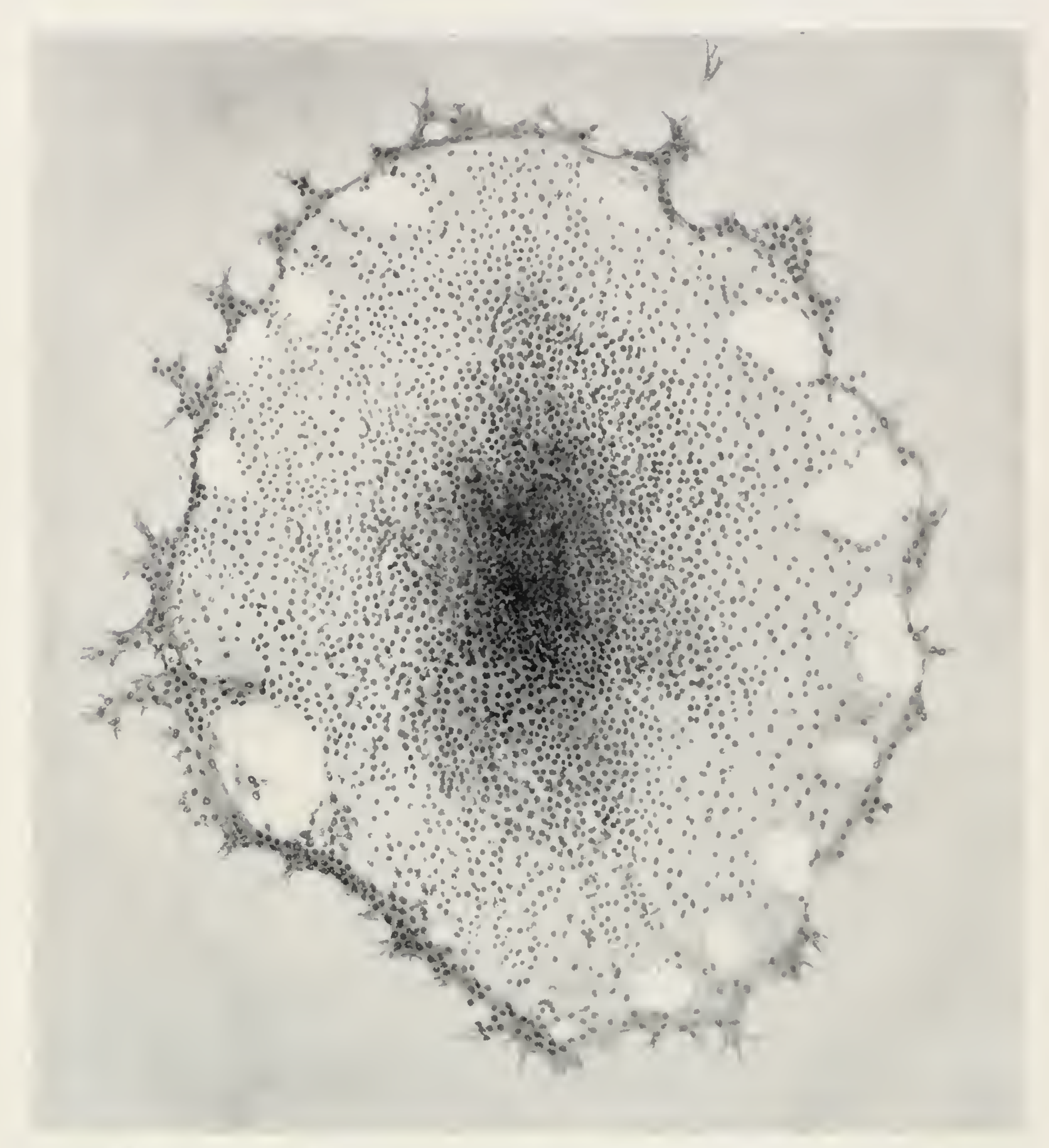


Abb. 95. Mäusekarzinomzellen, 5 Tage in Taubenplasma gezüchtet. Nach Lambert u. Hanes 1911. Journ. of exp. med. Bd. 14.

ja verhältnismäßig leicht aus jeder chirurgischen Klinik zu bekommen sind, zu nehmen, da diese sehr häufig schon nekrotisch sind und Bakterien enthalten. Am leichtesten wird ein Mäusesarkom zu beschaffen sein.

Interessant ist die von vielen Forschern gemachte Beobachtung, daß das Stroma des Tumors eine andere Auswanderungsgeschwindigkeit hat wie die Tumorzellen (Abb. 96). Diese sind fast immer an der äußersten Peripherie des Mediums zu finden, wo sie in dichtem Kranze

gelagert erscheinen. Will man überpflanzen, so muß man an dieser Zone die Zellen sammeln. Die Stromazellen dagegen wandern langsam aus. Ihre bindegewebige Natur ist besonders bei dem abgebildeten Hundekarzinom erkenntlich. Hat man dieses Hundekarzinom 3 Wochen lang gezüchtet, so sind nur runde Karzinomzellen in dem Medium

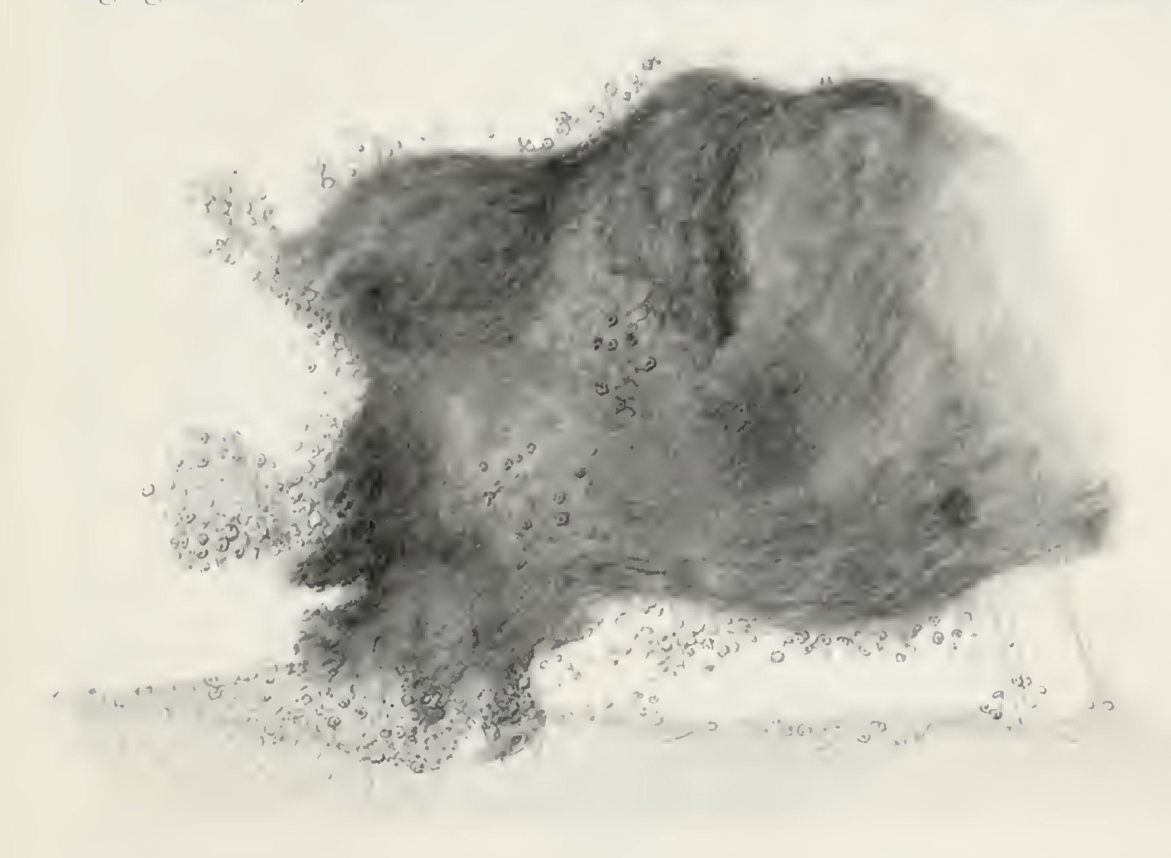


Abb. 96. Basalzellen-Karzinom des Hundes. 3 Tage in homogenem Plasma gezüchtet. Zeigt deutlich die Trennung der Karzinom- und der Stromazellen. Weitaus die meisten Zellen des Karzinoms sind in das Plasma ausgewandert, das sich an drei Seiten um das eingepflanzte Ursprungsstück schon verflüssigt hat. Nach dem Leben (Erdmann, Original).

vorhanden, die ohne bindegewebigen Zusammenhang das Medium erfüllen. Genau so wie die Epithelien wächst das Karzinom in Schleiern, das Sarkom ist dem Bindegewebe ähnlicher und wächst in einzelnen Strängen.

Die einzelne Tumorzelle, die sich also frei im Plasma (Seite 46, Abb. 42 u. 43) bewegt, ist von anderen Gewebszellen durch mehrere Eigenschaften ausgezeichnet. Selten gibt es Zellen, deren Pseudopodien solche abenteuerliche und groteske Form annehmen wie die der Tumorzelle. Auch die Größe der Tumorzelle imponiert im allgemeinen. Granula der verschiedensten Art finden sich reichlich in ihnen. Lebend beobachtet man die stark lichtbrechenden sog. Degenerationsgranula und die durch ihr verschiedenes Lichtbrechungsvermögen kenntlichen Fettkügelchen. Beide lassen sich auch getrennt färberisch darstellen. Zellteilungen mit sonderbaren Kernteilungsfiguren sind in den Tumorzellen häufig Doch sind auch regelmäßige Mitosen reichlich vorhanden.

Totalpräparate werden am besten mit Hämatoxylin-Eosin angefertigt und können besonders bei Karzinomen gut mit starken Vergrößerungen

beobachtet werden, weil der schleierartige Gewebskomplex höchstens 2—3 Zellschichten dick ausgebreitet ist. (Siehe Abb. 95.)

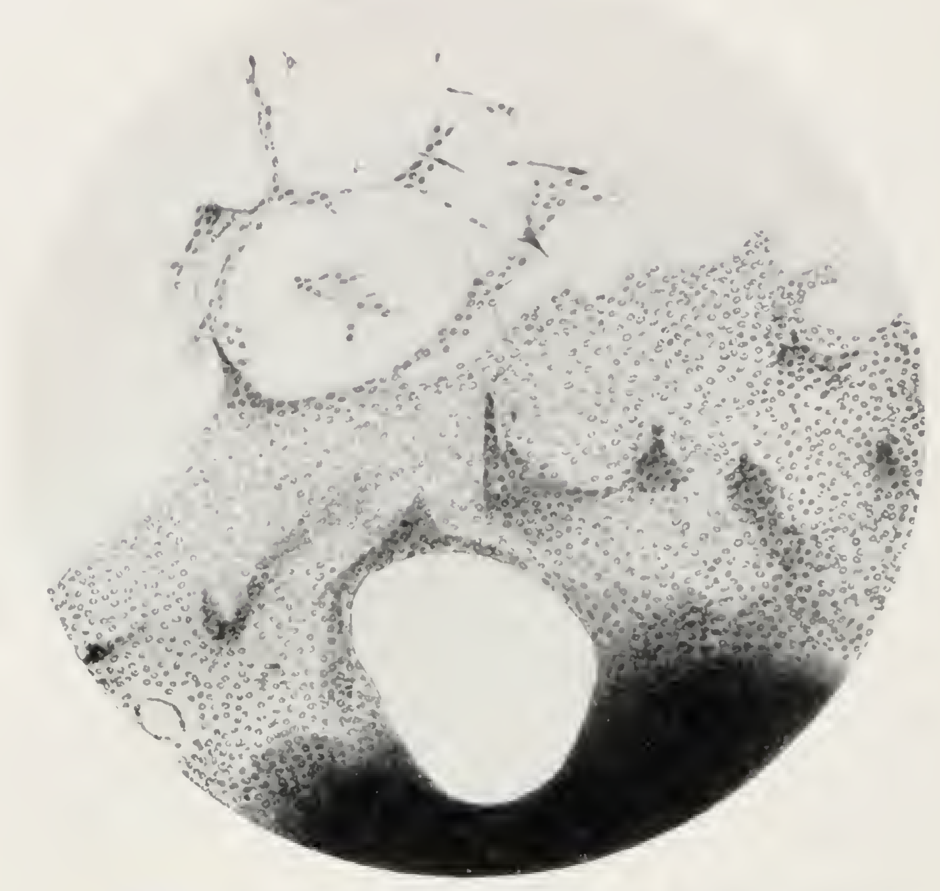


Abb. 97. Mäusekarzinomzellen, stärker vergrößert, in Meerschweinchenplasma gezüchtet. Nach Lambert und Hanes wie Bild 95.

Auch stellen die Tumorzellen ein geeignetes Objekt dar, um vermittels Lykopodiumsporen oder Karmin usw. die Phagocytose nachzuweisen. Man bringt Lykopodiumsporen, Karmin oder japanische Tusche in das Medium (Seite 45 u. 46, Abb. 37—43) und sieht alsbald, wie die Zellen diese aufgenommen haben.

Drew'sche Lösung.

Na Cl	0,900
K Cl	0,042
$NaHCO_3$	0,020
$CaCl_2$	0,020
$CaH_4(PO_4)_2$	0,010
$MgHPO_4$	0,010
H_2O	100,0

Man hält sich Salzlösungen 10 mal so stark als sie später gebraucht werden, in Flaschen. Also: Na Cl, K Cl, $NaHCO_3$, $CaCl_2$, $CaH_4(PO_4)_2$, $MgHPO_4$. Dann fülle man 10 ccm dieser Lösungen in eine Flasche und füge 40 ccm dest. Wasser dazu. Die $CaCl_2$-Lösung, die $CaH_4(PO_4)_2$-Lösung und die $NaHCO_3$-Lösung sind gerade vor dem Gebrauch angesetzt und dann im Dampftopf kurz sterilisiert. Es ist nicht richtig, diese Lösungen in Autoklaven zu sterilisieren. Dann füge man auch 10 ccm von jeder dieser Lösungen hinzu. Die fertige Lösung soll schwach blau opaleszieren. Will man doch den Autoklaven benutzen, so soll man nur dann die Lösungen benutzen, wenn sie kein Präzipitat zeigen.

Färbung von Fett mit Sudan III oder Scharlach R.

Die Präparate werden wie üblich bei der Fettfärbung mit nicht Fett lösenden Flüssigkeiten konserviert (Osmiumsäure, Formol usw.), gewässert in aqua dest. und 5 Min. in Alkohol 50%.

Als Farblösung verwendet man Sudan III oder Scharlach R, die beide in gesättigter Lösung angewandt werden und fertig im Handel zu haben sind; Färbdauer: 10 Min. bis 1/2 Stunde. Abspülen in Alkohol 50 proz., auswaschen in Aqua dest. Nachfärbung mit Hämatoxylin Delafield, wie dort angegeben; nach dem Differenzieren bringt man die Präparate in Brunnenwasser, wo sie nachblauen, führt sie durch die Alkoholstufen; Alk. abs. + Xylol; Xylol; Zedernöl.

Glykogenfärbung nach Best nach Fixierung mit 96% Alkohol.

Vorfärbung mit Hämatoxylin Delafield, wie angegeben; darnach Färbung in folgender, stets frisch zu bereitender Mischung:

Bestsches Karmin (filtriert)	2 Teile,
Liqu. ammonii caust.	3 ,,
Methylalkohol	6 ,,

Diese Mischung, die, wie schon gesagt, jedesmal vor der Färbung frisch zu bereiten ist, darf nicht filtriert werden.

Färbdauer: 1 Stunde.

Zum Entfärben bereite man sich folgende Lösung:

Methylalkohol	2 Teile,
Alkohol absol.	4 ,,
Aqua dest.	5 ,,

Die Entfärbung dauert ca. 10—12 Minuten, während der Entfärbung soll man die Mischung ein paarmal wechseln. Abspülen in 80% Alkohol; darnach Alk. 96 proz.; Alk. absol.; Alk. absol. + Xylol; Xylol; Zedernöl.

Die Karminfarbe, die zu obiger Färbung verwandt wird, bereite man sich folgenderweise:

Ammon. chlorat.	2 g	
Lithion carbonic.	0,5 g	einmal aufkochen lassen.
Aqua dest.	50 g	

Nach Erkalten 20 ccm Liqu. ammonii caust. zusetzen. Diese Lösung ist im Dunkeln aufzubewahren, sie ist brauchbar etwa vom 3. Tage an und durch einige Wochen.

Die Frage, wie wirken Bakterien und lebende Zellen aufeinander, wenn sie experimentell zusammengebracht werden, können wir im hängenden Tropfen gut beobachten.

Wie wir gesehen haben, entstehen Vakuolen im Laufe der Züchtung von Mesenchymzellen (Vergl. Abb. 53, S. 58) ganz besonders gerade in dieser Zellart, während die Epithelzellen im Verhältnis zu den Mesenchymzellen viel kleinere Vakuolen haben, ebenso die Myoblasten. Während diese in einer 14 Tage alten Kultur, nachdem man sie fixiert und gefärbt hat, wie ein feines Sieb aussehen, gleichen die Mesenchymzellen mehr einem durchlöcherten Tuche. Man nimmt an, daß die Vakuolen in den Kulturen ganz besonders früh sich bilden, wenn die Dextrose der Locke-Lewis-Lösung z. B. aufgebraucht ist oder wenn sie aus experimentellen Gründen fortgelassen ist. Jedenfalls aber steht fest, je kürzer die Zellen in der Kultur sind, je weniger Vakuolen haben sie. Daher zeigt der Versuch von M. Lewis, die Tuberkelbazillen mit wachsenden Mesenchymzellen zusammen brachte, überraschende Resultate, denn hier wurde schon nach einem Tage, nachdem die Bakterien der Kultur zugefügt waren, eine so starke Vakuolisierung wie sonst nie erreicht (Abb. 98).

Man verfahre (29. Übung) wie folgt: Nachdem Kulturen von Hühnermesenchymzellen hergestellt sind in LOCKE-LEWIS-Lösung, so lasse man sie 24 Stunden wachsen. Dann füge man vorsichtig mit einem kleinen Spatel eine geringe Anzahl Bakterien hinzu, nachdem man unter der Lupe die Kulturen umgedreht hat. Hierauf befestige man sie wieder auf einem neuberingten, hohlgeschliffenen Objektträger. Zwei Momente sind noch zu beachten. Man lege sich auch Kulturen derselben Bakterien im hängenden Tropfen in LOCKE-LEWIS-Lösung an, die ohne Gewebe sind und lasse auch einige Kulturen ohne Bakterien stehen.

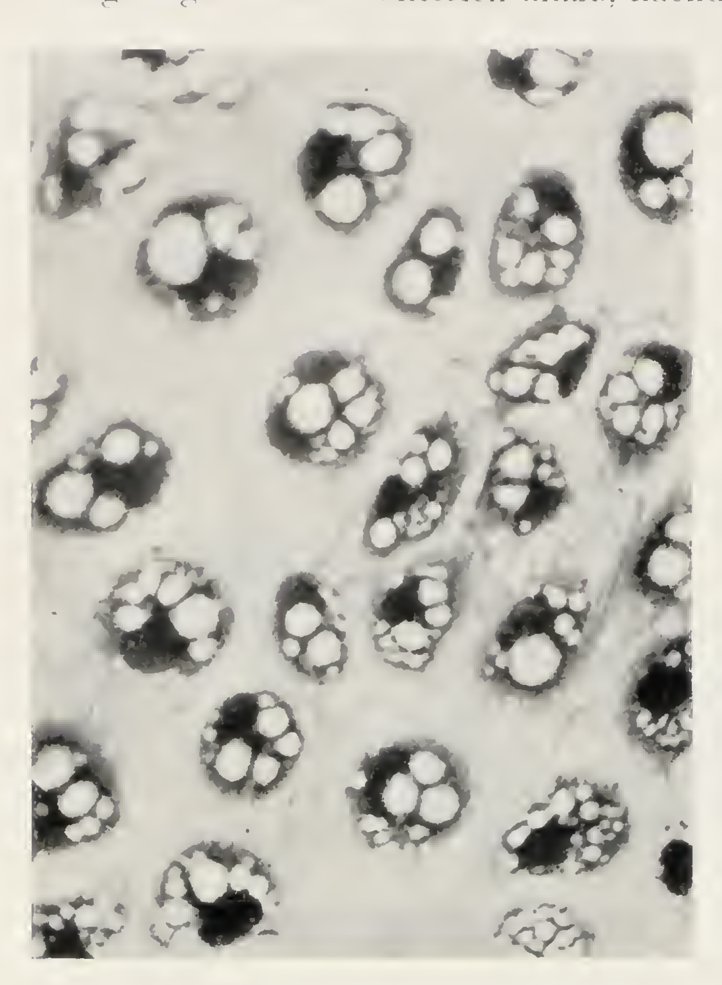


Abb. 98. Mesenchymzellen des embryonalen Huhnes nach Einfügen von Typhusbakterien. Beachte die großen Vakuolen in den Zellen. Nach W. Lewis. 1921 Journ. of exp. med. Bd 33.

Schon am nächsten Tage sind die Mesenchymzellen voller Vakuolen. Nicht alle Stämme arbeiten so rasch. Es kommt auf die Virulenz des Stammes an, ob schnell sehr viele Vakuolen gebildet werden. Jedenfalls zeigt dieser Versuch deutlich, daß das Zelleben schädigende Stoffe von den Bakterien ausgeschieden werden müssen. Welcher Art sie sind, muß noch erforscht werden. Es gibt auch zum Nachdenken Anlaß, warum man die Bakterien nicht gleich beim Ansetzen der Kulturen mit hineinsetzen kann, denn dann erzielte man kein Bakterienwachstum, vorausgesetzt, daß man nur wenig Bakterien eingesetzt hat. Die bakterizide Wirkung der embryonalen Gewebe ist so stark, daß kein Gleichgewicht zwischen Bakterienzelle und Gewebezelle sich sofort einstellt. Je älter aber die Zelle in der Kultur ist, je schwächer reagiert sie gegen die Angriffe der Bakteriengifte.

Mit Hilfe der Gewebezüchtung muß sich das Problem lösen lassen, ob die Zellen des Reticulums in einem genetischen Zusammenhange mit Wanderzellen, Endothelzellen und Riesenzellen stehen. Lewis hat dies durch Züchtung der Lymphknoten des Menschen zu entscheiden versucht.

Die Lymphknoten des Menschen, die leicht zu beschaffen sind, enthalten Lymphocyten mit und ohne gelappten Kern, Lymphoblasten, Plasmazellen, eosinophile Zellen, Mastzellen und die Zellen des Reticulums und der Lymph- und Blutgefäße nach STÖHR.

Man verfahre beim Anlegen der Kulturen (30. Übung) auf folgende Weise: Aus einem eben operierten oder eben gestorbenen menschlichen Körper entnommene Lymphknoten präpariere man von allem Fett und Bindegewebe frei und lege wie üblich Kulturen im menschlichen Plasma mit $^1/_4$ Hühnerplasma gemischt an. Man will nachweisen, ob die sog. Spindelzellen in einem genetischen Zusammenhange mit Wanderzellen, Endothelzellen und Riesenzellen stehen.

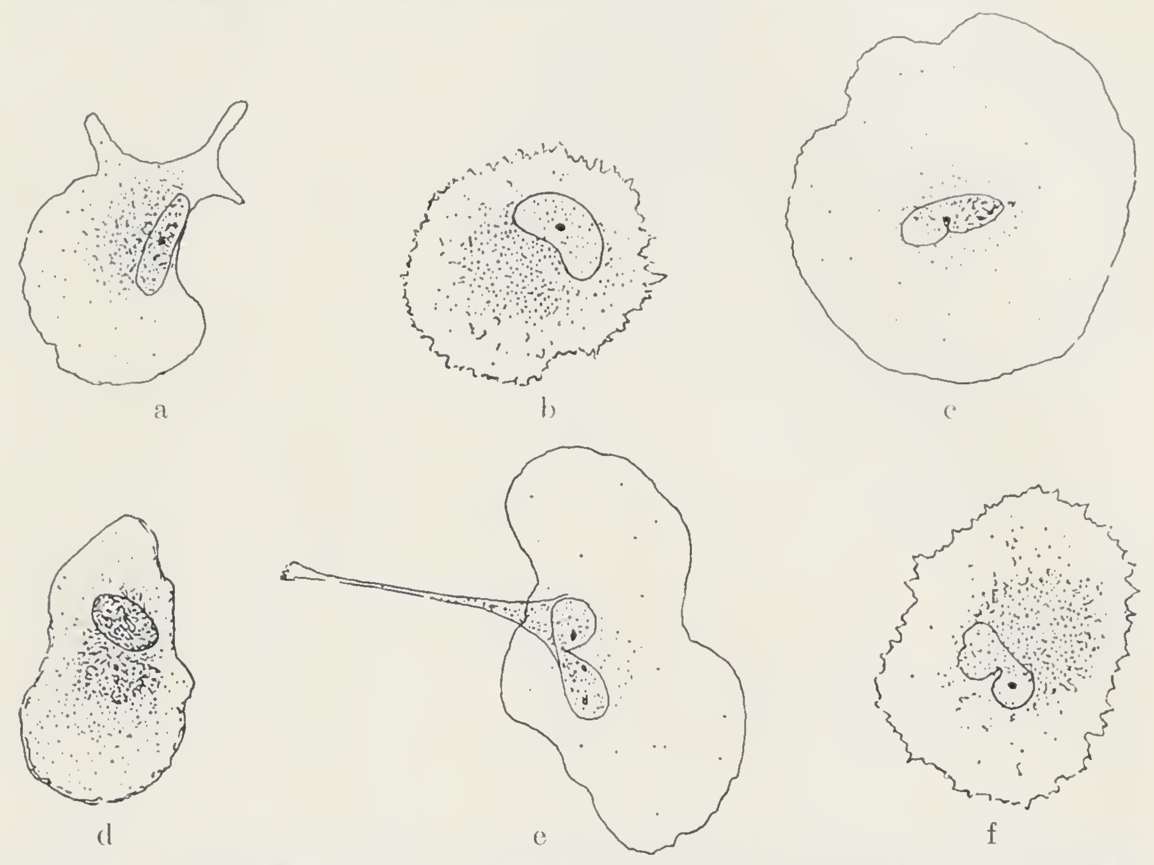


Abb. 99, a—f. Endothelzellen aus menschlichen Lymphknoten. a—c typische Endothelzellen (nach Lewis), 2 Tage in Menschenplasma gezüchtet, d—e Übergangsformen, aus denen spitze Spindelzellen werden. Nach W. Lewis. 1921. Journ. exp. Med. Bd. 34.

Schon nach kurzer Zeit bewegen sich die Lymphozyten in allen möglichen Formen aus dem eingeflanzten Lymphknotenstückchen heraus. Man tut gut, die Bahn eines solchen zeichnerisch zu verfolgen. Weiterer Entwicklung sind diese Formen soweit ich beobachten konnte, nicht fähig.

Die „Wanderzellen" der Pathologen erscheinen nach den Lymphozyten. Sie bewegen sich schnell aus den Lymphknoten heraus und zeigen starke Formveränderungen. Hierauf folgen die Endothelzellen, die stark phagocytieren, aber sich langsam bewegen, wie wir schon zugleich mit der Bildung von Riesenzellen früher (s. Seite 40) verfolgt haben.

Gewöhnlich sind die Endothelzellen rund, der Kern liegt in der Mitte, er kann eingedellt sein. Das Plasma ist nur mit staubartigen Körnchen, keinen Granulationen am Anfang der Züchtung gefüllt. Oft ist der Rand des Plasmas auch fein gezähnt. In der Kultur werden nun diese Zellen allmählich auf zwei verschiedene Arten geändert. Entweder bilden sich aus ihnen die sog. Spindelzellen, die sich nur

durch die gestreckte Form und den ausgezogenen Kern von den Endothelzellen unterscheiden (Abb. 99e). Oder aber durch fortgesetzte Kernteilungen und Vergrößerungen des Plasmas werden Riesenzellen aus diesen Formen. Es können auch mehrere Wanderzellen zur Bildung einer Riesenzelle zusammentreten. Bei all diesen Zellarten findet kein Zusammenschluß zu echten Geweben statt.

Es scheint also ein Zusammenhang zwischen Endothelzellen und fibroblastähnlichen Spindelzellen einerseits und Endothelzellen und Riesenzellen andererseits zu bestehen. Auch schließen sich die Wanderzellen, die höchstwahrscheinlich junge Endothelzellen sind, zu Riesenzellen zusammen. Aber es scheint kein Zusammenhang zwischen Lymphocyten einerseits, Wanderzellen, Endothelzellen und Riesenzellen andererseits zu bestehen, wenn man ihr Verhalten in der Gewebekultur ansieht.

Als letzte Übung werden wir einige Angaben von Hadda und Rosenthal nachprüfen. Hadda und Rosenthal haben schon 1913 versucht: „mit Hilfe des Zellzüchtungsverfahrens neue Einblicke in die Wirkungsweise cytotoxischer Sera auf Gewebszellen zu gewinnen". Zwar bestehen nach ihnen — und dieses ist ja schon 1913 geschrieben — noch erhebliche technische Schwierigkeiten, aber wenn diese überwunden sind, so darf die Kultur lebender Zellen außerhalb des Körpers fast als eine Idealmethode der Cytotoxin-Untersuchung bezeichnet werden, denn sie gewährleistet: 1. für lange Zeit die Lebendigkeit der kultivierten Gewebe, 2. schafft sie unter vitalen Bedingungen die Möglichkeit eines tagelangen Kontakts der Gewebezellen mit den cytotoxischen Substanzen und gibt hierdurch feinste biologische Reaktionsmöglichkeiten. Hadda und Rosenthal selbst nun untersuchten den Einfluß haemolytischer Sera auf die Haut und den Knorpel des Huhnes. Es wurde Hühnerhaut in Kaninchenplasma gezüchtet und sie fanden, daß die Organzellen sich außerhalb des Körpers in heterogenem Plasma entwickeln können, doch läßt sich zeigen, daß feinere Unterschiede in der Färbbarkeit bestehen. Dagegen scheinen Zellen des Hühnerknorpels, die einerseits in Normalplasma, andererseits in Kaninchenplasma gezüchtet werden, stärker geschädigt zu werden als die Organzellen der Haut. Die gleichen Versuche wurden für Haut und Knorpel einerseits in Normalplasma, andererseits in isolytischem Hühnerplasma ausgeführt. Hier zeigt sich auch bei dem Knorpel kein Wachstum, bei der Haut dagegen üppiges Wachstum. Durch weitere Experimente kommen die Autoren zu folgendem Ergebnis ihrer Kulturversuche: „Die Ergebnisse unserer Kulturversuche mit Hühnerknorpel und Hühnerhaut in Hühnerblut-Kaninchenimmunplasma zusammen mit unseren früheren Befunden vereinigen sich zu dem einheitlichen Resultat, daß Plasmen, die Normal-, Iso- oder Immunhaemolysine enthalten, auf die zur Proliferation gelangenden Zellen der lebendigen Hühnerhaut und des lebenden Hühnerknorpels cytotoxisch zu wirken vermögen, und daß die proliferierenden Zellen der genannten Gewebekulturen sich durch ihre differente Reaktionsfähigkeit gegenüber den Hämolysinen bis zu einem gewissen Grade gegeneinander abgrenzen lassen. Um diesen Versuch (31. Übung) teilweise nachzuprüfen, stellen wir uns

Hühner- und Kaninchenserum und Hühner- und Kaninchenplasma her. Gleich große Stücke Hühnerhaut setzen wir in diese vier verschiedenen Medien, lassen sie 1—2 Tage darin und färben dann das Präparat mit einer einfachen Haematoxylin-Eosin-Färbung. Es zeigt sich (s. Abb. 100 u. 101), daß die Kernmembran und die Kernkörperchen deutlicher darstellbar sind in arteigenen Medien wie die artfremden.

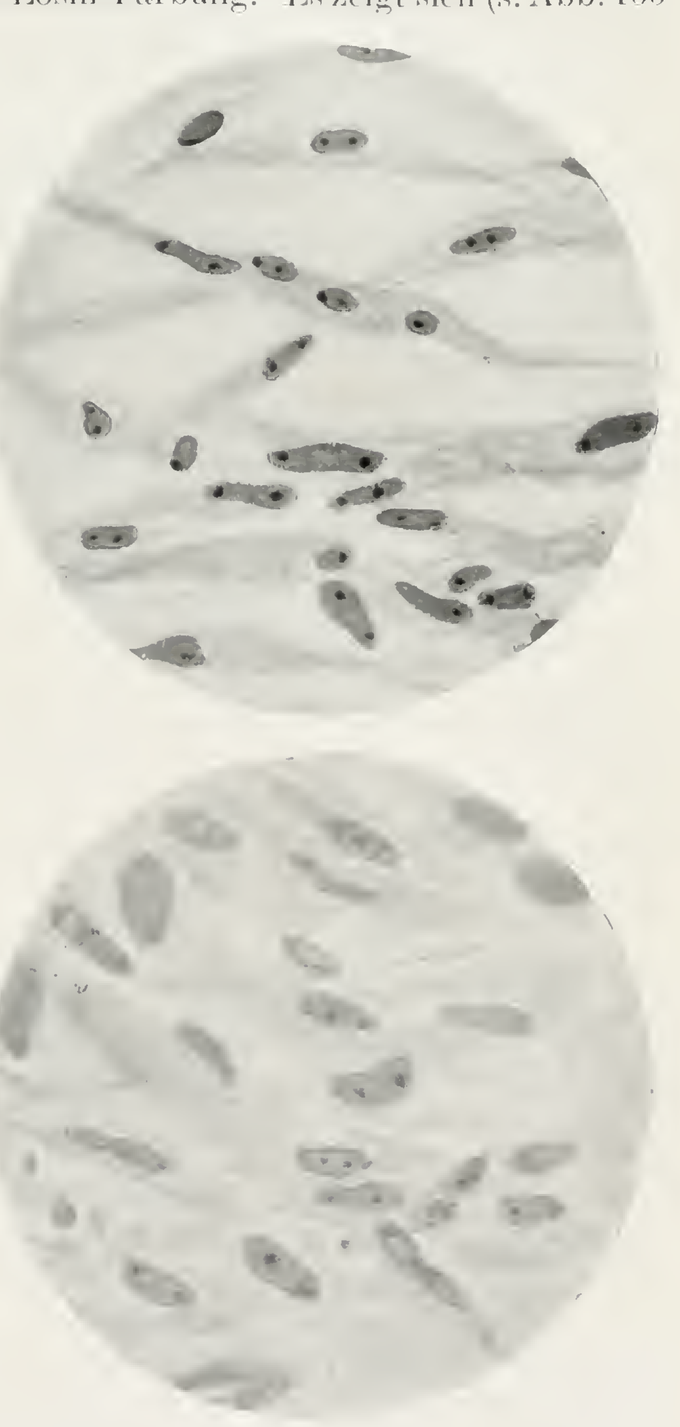


Abb. 100 u. 101. Embryonale Hühnerhaut in Hühnerplasma u. Kaninchenplasma gezüchtet. Beachte das Farbloswerden der Kernmembran und des Kernkörperchens im heterogenen Plasma. Nach Hadda und Rosenthal, 1913. Zeitschrift f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. Bd. 16.

Noch viel kompliziertere Probleme hat man mit Hilfe der Gewebezüchtung in Angriff zu nehmen versucht. Besonders aussichtsreich erschienen die Versuche, die auf den Gebieten der Serologie, Immunologie und Bakteriologie unternommen worden sind. In der vorletzten Übung ist das für die Bakteriologie gezeigt worden. Doch sind alle diese Versuche noch vereinzelt, da die Unterlage, die Züchtung von einer Art Zellen und die dauernde Erhaltung dieses Stammes bis jetzt noch nicht allgemein von den Forschern auf diesen drei eben erwähnten Gebieten geübt wird. Zwar haben schon Steinhardt und Lambert 1913 versucht, Pockenvirus in Cornea-Epithel zu züchten. Mit diesem, einige Tage gezüchteten embryonalen, infizierten Material wurde dann auf die übliche Weise geimpft, d. h. das Material wurde in die rasierte Haut eingerieben. Es zeigten sich eine Reihe von Pusteln, doch ist nicht nachgewiesen, ob das Pockenvirus sich in dem Zuchtmedium vermehrt hat.

Einen Schritt weiter ging Erdmann 1917 und 1920. Hier wurde virulentes Gehirnmaterial von an Hühnerpest erkrankten Tieren in

Hühnerplasma gezüchtet und virulentes Serum auf normalem embryonalen Hühnergewebe gezüchtet. Die Hühnerpest ist eine hochvirulente Krankheit. Sie tötet das Huhn gewöhnlich in 36—48 Stunden. Mit dem so gezüchteten Material konnte aber eine Abschwächung des Virus nachgewiesen werden. Wenn man so gezüchtetes Material in normale Hühner verimpfte, so starben sie erst nach 14 Tagen. Getrocknetes Gehirnmaterial solcher Tiere aber konnte zu erfolgreicher aktiver und passiver Immunisierung gegen Hühnerpest verwandt werden. Diese Methode der Immunisierung wird sich wahrscheinlich auch auf alle anderen Krankheiten, die durch filtrierbare Vira erzeugt werden, übertragen lassen. 1920 hat auch KUCZINSKY versucht, mit Hilfe eines etwas abgeänderten Mediums Fleckfiebervirus zu züchten. Diese Versuche sind aber noch nicht abgeschlossen.

Hier werden sich noch viele neue Verwendungsmöglichkeiten der Züchtung der lebenden Gewebe finden lassen. Damit vielen späteren Forschern diese Methode geläufig wird, muß sie schon am Schluß des Universitäts-Studiums wenigstens in dieser vorliegenden elementaren Weise gelehrt werden. Selbstverständlich kann der Forscher mit noch feineren Methoden der Gewebezüchtung, als sie in diesem Anfänger-Praktikum der Gewebezüchtung geschildert sind, arbeiten. So empfiehlt es sich, für Forschungsarbeiten die Zusammensetzung der Medien auf ihre Hydrogen-Jonen-Konzentration zu prüfen. Am besten sollen die Zellen in einem Medium wachsen, das 7,2 Hydrogen-Jonen-Konzentration hat. Man bedient sich der Methode von L. MICHAELIS oder der Methode von FELTON zur Feststellung der Hydrogen-Jonen-Konzentration. Man gebraucht die erstere, wenn man größere Mengen Flüssigkeit zu untersuchen hat, die andere bei minimalen Quantitäten.

Um feinere Operationen an der Zelle selbst auszuführen, also, um evtl. Fibrillen oder Pseudopodien abzuschneiden oder Kerne herauszunehmen oder anzustechen, ist der sogenannte Barber-Apparat zu empfehlen; in kurzer Zeit wird ein Apparat von Zeiß auf den Markt gebracht, der noch besser als der Barber-Apparat Mikrosektionen erlaubt. In den 3 Ebenen des Raumes können Nadeln verschoben werden, mit denen dann die Zelle oder das Gewebe zerschnitten oder entkernt werden kann.

Die hier ausführlich beschriebenen Übungen stellen die ersten Versuche dar, die Methode der Gewebezüchtung im Kursbetrieb lehrbar zu machen. Noch bessere Übungen werden sich im Laufe der Zeit finden, die dem Anfänger noch günstigere Resultate sichern.

Eines aber ist gewiß, die Zusammensetzung der Medien wird sich bestimmt ändern. Vergeht doch nicht eine Woche, in der nicht neue Zusammensetzungen von analysierbaren Medien empfohlen werden. Es besteht selbstverständlich das Bestreben, alle organischen Bestandteile des Mediums auszuschließen, damit man ein quantitativ bestimmtes Medium hat. So beschreibt EBELING 1920 ein Medium, das aus Fibrin, Serum und Embryonal-Extrakt des betreffenden Tieres besteht. Das Fibrin vertritt die Stelle des Plasmas. Es ist durch Fällung aus dem Plasma des Tieres gewonnen und kann infolgedessen chemisch be-

stimmt werden, doch auch in diesem Medium sind 2 Komponenten, deren chemische Zusammensetzung nicht bekannt ist: Serum und Embryonal-Extrakt. Das Serum in größeren Mengen angewandt, hemmt das Wachstum und darf nur in geringeren Quantitäten verwandt werden. Das Wachstum fördernde ist hier der Embryonal-Extrakt, dessen chemische Zusammensetzung ja unbekannt ist und der mit dem Serum als isotonischer Flüssigkeit gemischt wird.

Solange man noch Embryonal-Extrakt und Plasma nimmt, sind stets unbekannte Größen in dem Medium. Bis jetzt haben wir angenommen, daß Wachstumshormone, die ihren Sitz in der lebenden Zelle haben, unbedingt notwendig sind, um embryonale oder entdifferenzierte Zellen am Leben zu erhalten. Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß dies vielleicht Wundhormone sein können, denn mit dem Embryonal-Extrakt, der noch notwendiger zu sein scheint, als das Plasma, werden stets auch Wundhormone aus den zerquetschten Zellen im Embryonal-Extrakt sich finden. Ob Wundhormone oder Wachstumshormone dasselbe sind, ist noch nicht untersucht. Verwandt in ihrer Wirkung werden sie sicher sein. Wir sind heute also noch nicht zu Ende mit dem Ausprobieren der rechten Medien. Wir haben noch nicht die Stufe erreicht, die schon lange die Bakteriologie kennt, nur mit analysierbaren Medien zu operieren. Doch auch hier ist für die Aufzucht mancher Formen ein gewisses unbekanntes Agens notwendig, das mit dem Blute, mit der Lymphe oder mit der Aszitesflüssigkeit dem Nährmedium zugeführt wird.

Wenn nun in Zukunft diese letzte Frage der Auswahl des Mediums vollständig einwandfrei gelöst ist, also die Zusammensetzung des Mediums chemisch quantitativ vollkommen analysierbar ist, so wird sich hoffentlich ein anderer Nachteil der Gewebezüchtung überwinden lassen, nämlich der, daß man nur verhältnismäßig kleine Stücke züchten kann. Wird die Methode der Gewebezüchtung erst handlich, erfordert sie nicht mehr so viel Zeit wie jetzt, so wird man sich an die Lösung schwierigerer Probleme mit Erfolg heranwagen können. Dann erst wird die Ernährungsphysiologie feststellen können, welche Nahrungsstoffe und welche äußeren Bedingungen Bindegewebszellen oder Epithelzellen zu ihrer dauernden Erhaltung bedürfen. Dann erst wird das kausalanalytische Experiment an Zellen und Geweben in größerem Umfange einsetzen können, sowie bei der Explantation von Organen, Organteilen und Embryonen erst bedeutsame Fortschritte gezeitigt wurden, seitdem Roux durch die Explantation einen der Grundsteine seiner kausalanalytischen Forschung, der Entwicklungs-Mechanik, gelegt hat.

Zusammenstellung des Materials und der einschlägigen Literatur.

Ehe ich eine Zusammenstellung der Übungen und der dabei gebrauchten Materialien gebe, möchte ich für diejenigen, die sich weiter orientieren wollen, folgende Zusammenfassungen erwähnen:

Oppel, A., 1914, Gewebekultur und Gewebepflege im Explantat. Sammlung Vieweg: „Tagesfragen aus den Gebieten der Naturwissenschaft und der Technik", Heft 12. Oppel schildert besonders die Anwendung der Gewebepflege als Mittel der kausalanalytischen Forschung. — Erdmann, Rh., 1921, Einige grundlegende Ergebnisse der Gewebezüchtung aus den Jahren 1914—1920. Sonderdruck aus: „Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte", Bd. 23 gibt eine fast vollständige Literaturangabe bis zum Jahre 1919. Wertvoll ist auch die Zusammenstellung von Levi, G., 1919, Ricerche Istologiche sul alcuni tessuti in istato di sopravivenza in vitro. Bollet. 1—2 della Societa Med. Chir. di Pavia, S. 1—599[1]).

Zum tieferen Eindringen in die Spezialprobleme und eine richtige Fragestellung möchte ich folgende Arbeiten empfehlen: Für die Probleme der Zellbewegung, Zellwanderung und Zellannäherung Roux, W., Arch. f. Entwicklungsmechanik, Bd. 1, S. 43; Bd. 3, S. 380. — Besonders wichtig sind die gesammelten Abhandlungen über Entwicklungsmechanik der Organismen desselben Verfassers 1895, Leipzig, Bd. 1 und 2.

Wichtig ist auch für die allgemeine Orientierung: Driesch, H., 1898, Resultate der Entwicklungs-Physiologie der Tiere. Sonderdruck aus: „Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte", Bd. 8.

Von Bedeutung wird sich auch L. Loebs ältere Methode 1898, geronnenes Blut von Limulus als Nährmedium zu brauchen, erweisen. Loeb, L., 1920, The movements of the amoebocytes and the experimental production of amoebocyte (cell-fibrin) tissue. Washington Univ. Studies. Vol. 8: Scientific Series, Nr. 1, pp. 3—79. — Loeb, L., 1921, Amoeboid movement, tissue formation and the consistency of protoplasm. Science, N. S., vol. 53, p. 261.

Auch von Botanikern ist die Methode der Gewebepflege angewandt. So findet sich eine Zusammenfassung dieser und ähnlicher Materien von Haberlandt, G., 1922, Über Zellteilungshormone und ihre Beziehungen zur Wundheilung, Befruchtung, Parthenogenesis und Adventivembryonie. Biologisches Zentralblatt, Bd. 42, Nr. 4, S. 145—172; und Lamprecht, W., Über die Kultur und Transplantation kleiner Blattstückchen. Beiträge zur allgemeinen Botanik, 1. Bd., 1918.

Als wichtig für die feinere Technik sind folgende beiden Arbeiten zu erwähnen: Barber, M. A., 1911, Technique for inoculation into living cells. Journ. Inf. Diseases 8, 348—360, 5 figs. in text. — Barber, M. A., 1914. The pipette method in the isolation of single microorganism and in the inoculation of substances into living cells. Philippine Journ. Sci. 9, Ser. B., 307—385, 19 figs. in text. — Dazu eine weitere Arbeit von Chambers, R., 1918, The micro-vivisection method. Biol. Bull. 34, 120—136, 8 figs. in text.

Für die richtige Zusammensetzung des Mediums in bezug auf die Hydrogen-Ionen-Konzentration sind die Arbeiten von L. Michaelis und Felton zu erwähnen: Michaelis, L., Die allgemeine Bedeutung der Wasserstoffkonzentration für die Biologie. In Oppenheimer, C.: „Handbuch der Biochemie der Menschen und der Tiere." Jena 1913, Suppl. 10: Die Wasserstoff-Ionen-Konzentration. Berlin 1914: Die Bedeutung der Wasserstoff-Ionen-Konzentration des Blutes und der Gewebe. Deutsche Med. Wochenschrift 1914, Bd. 40, S. 1170. — Felton, L. D., The Colorimetric Method for Determining the Hydrogen Ion Concentration of Small Amounts of Fluid. From the Patholog. Laborat. Johns Hopkins Med. School. Baltimore 1921, Febr. 1, pag. 299—305.

---

[1]) Ich möchte nicht unterlassen auf die kurze, soeben erschienene Zusammenstellung von H. BRAUS: Methoden der Explantation (Gewebekulturen in vitro) hinzuweisen. (Sonderabdruck Handb. biol. Arbeitsmethoden, ABDERHALDEN, Lief. 69.) Besonders auf Züchtung der Kaltblütergewebe ist hier eingegangen.

Zusammenstellung der Übungen.

1. Übung.

Seite 19—26.

Material: Haut des erwachsenen Frosches.

Medien und Waschflüssigkeiten: Froschplasma, Augenkammerwasser, Ringerlösung, physiologische Kochsalzlösung und Locke-Lewis-Lösung für Kaltblütler.

Einschlägige Arbeiten: UHLENHUTH, E., 1914, Cultivation of the Skin Epithelium of the Adult Frog, Rana Pipiens. Journ. of exp. Med., Bd. 20, S. 614. — UHLENHUTH, E., 1916, Die Zellvermehrung in den Hautkulturen von Rana pipiens. Arch. f. Entw.-Mech., Bd. 42, S. 168—207. — GASSUL, R., Implantation der explantierten Froschhaut. 1922, Arch. f. Entw., im Druck.

2. Übung.

Seite 26—29.

Material: Rückenhaut von Rana esculenta und Rana fusca.

Medien und Waschflüssigkeiten: Hühnerplasma, Froschplasma, Augenkammerwasser und Ringerlösung für Kaltblütler.

Einschlägige Arbeiten: UHLENHUTH, E., 1915, The Form of the Epithelial Cells in Cultures of Frog Skin, and in its Relation to the Consistency of the Medium. Journ. of exp. Med., July 1., Bd. 22, S. 76—104.

3. Übung.

Seite 38—41.

Material: Milz der erwachsenen Katze.

Medien und Waschflüssigkeiten: Plasma und Embryonal-Extrakt der Katze; falls keine Katze vorhanden, Plasma und Embryonal-Extrakt der Ratte, Ringerlösung für Warmblütler.

Einschlägige Arbeiten: LAMBERT, R. A., 1912, The production of foreign body giant cells in vitro. Journ. of exp. Med., Bd. 15.

4. Übung.

Seite 41—42.

Material: Embryonale Hühnermilz, 16 Tage alt.

Medien und Waschflüssigkeiten: Hühnerplasma, Hühnerserum, Ringerlösung für Warmblütler, 2% Agarlösung.

Einschlägige Arbeiten: INGEBRIGTSEN, R., 1912, Studies on the growth of tissue outside the organism. Journ. of exp. Med., Bd. 16, Nr. 4, S. 421—431.

5. und 6. Übung.

Seite 42—45.

Material: Knochenmark eines jungen und eines gut gefütterten älteren Huhnes.

Medien und Waschflüssigkeiten: Hühnerplasma.

Einschlägige Arbeiten: FOOT, N. Ch., 1912, Über das Wachstum des Knochenmarks in vitro. Experimenteller Beitrag zur Entstehung des Fettgewebes. Zieglers Beiträge zur Pathologie. Bd. 53, S. 446. — FOOT, N. Ch., 1913, The growth of chicken bone marrow in vitro and its bearing on hematogenesis in adult life. Journ. of exp. Med., Bd. 17, S. 43—60. — ERDMANN, Rh., 1917, Some observations concerning chicken bone marrow in living cultures. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., Bd. 14, S. 109—112. ERDMANN, Rh., 1917, Cytological observations on the behaviour of chiken bone marrow in plasma medium. Am. Journ. Anatom. Bd. 22, S. 73—124.

7. Übung.

Seite 45—47.

Material: Hühner-, Ratten- und Menschenmilz.

Medien und Waschflüssigkeiten: Das betreffende Plasma und Embryonal-Extrakt des Tieres, das gebraucht wird. Falls man den Menschen nimmt,

Menschen- und Hühnerplasma. Sterile Lycopodiumsporen, sterile zerriebene Karminteilchen, japanische Tusche. Ein Röhrchen mit einer Reinkultur von Tuberkelbazillen.

Einschlägige Arbeiten: VERATTI, E., 1919, Richerche histologiche sul alcuni tissuti in istato di sopravivenza in vitro. Boll. Soc. Med. Pavia. — LAMBERT und HANES, 1911, Migration by amoboid movement of sarcoma cells growing in vitro and its bearing on the problem of the spread of malignant growth in the body. Journ. Americ. Med. Ass., Bd. 6, S. 791—792. — LAMBERT, R. A., und HANES, F. M., 1911, On the pagocytic inclusion of carmin particles by sarcoma cells growing in vitro with consequent staining of the cell granules. Proc. soc. exper. Biol. Med., Bd. 8, S. 113—114.

8. Übung.

Seite 47—50.

Material: Fertige Kulturen von Mesenchymzellen des Huhnes oder des Meerschweinchens, Janusgrün, Janusschwarz, Neutralrot gelöst in Locke-Lewis-Lösung ohne Dextrose in Verdünnungen: Janusgrün: 1 : 40 000; Neutralrot: 1 : 80 000; Ringerlösung.

Einschlägige Arbeiten: LEWIS, M., 1917, Development of connective-tissues fibres in tissues cultures of chick embryos. Contrib. of Embr., N. 17. Extracted from Publ. 226 of the Carnegie Institution of Washington. — LEWIS, W. H., 1920, The effect of potassium permanganate on the mesenchyme cells of tissue cultures. Americ. Journ. Anat., Bd. 28.

9. Übung.

Seite 50—51.

Material: Fertige Kulturen von Mesenchymzellen des Huhnes oder des Meerschweinchens, Janusgrün, Janusschwarz, Neutralrot, gelöst in Locke-Lewis-Lösung ohne Dextrose, in Verdünnungen; Janusgrün 1 : 40 000; Neutralrot 1 : 80 000; Ringerlösung.

Einschlägige Arbeiten: LEVI, G., 1916, Il ritmo e le modalita della mitose nelle cellule viventi coltivate in vitro. Arch. Ital. Anat. Embriol., Bd. 15.

10. Übung.

Seite 51—53.

Material: Mesenchymzellen des Hühnerembryos, in Locke-Lewis-Lösung gezüchtet, hypertonische und hypotonische Lösungen von Locke-Lewis-Lösung, Ringerlösung.

Einschlägige Arbeiten: HOGUE, M. J., 1919, The effect of hypotonic and hypertonic solutions on fibroblasts of the embryonic chick heart in vitro. Journ. of exp. Med., Bd. 30, S. 617.

11. Übung.

Seite 53—56.

Material: Mesenchymzellen des Huhnes, einige Tage gezüchtet, Kal. permanganat-Lösung in Verdünnung 1 : 40 000—1 : 80 000, Ringerlösung.

Einschlägige Arbeiten: LEWIS, W. H., 1921, The effect of potassium permanganate on the mesenchyme cells of tissue cultures. Amer. Journ. Anat., Bd. 28.

12. und 13. Übung.

Seite 56—62.

Material: Hühnerembryonen vom 13.—18. Tage.

Nährlösungen und Waschflüssigkeiten: Hühnerplasma, Embryonalextrakt, Locke-Lewis-Lösung, Ringerlösung.

Einschlägige Arbeiten: CARREL, A., 1914, Present conditions of a strain of connective tissue 28 month old. Journ. of exp. Med., Bd. 20, Nr. 1, S. 1—2. — EBELING, A. H., 1919, A strain of connective tissue 7 years old. Journ. of exp. Med., Bd. 30, S. 531—537.

14. Übung.

Seite 62—74.
Material: Unterhautbindegewebe des erwachsenen Meerschweinchens, Kaninchens oder Huhnes.
Nährlösungen und Waschflüssigkeiten: Plasma des betreffenden Tieres, Embryonal-Extrakt, Ringerlösung.
Einschlägige Arbeiten: Siehe achte Übung und Maximow, A., 1916, The cultivation of connective tissue of adult mammals in vitro. Arch. russ. d'Anat., Histol. et Embriol., Bd. 1.

15., 16. und 17. Übung.

Seite 68—72.
Material: Hühnerembryonen, verschieden lang bebrütet, am besten 5 bis 6 Tage.
Nährlösungen und Waschflüssigkeiten: Locke-Lewis-Lösung, Ringerlösung.
Einschlägige Arbeiten: Lewis, M., 1917, Muscular Contraction in Tissue Cultures. 272, Publ. Carneg. Inst. — Lewis, M., 1917, Behaviour of cross striated muscle cells in tissue cultures. Am. Journ. of Anat., Bd. 22. — Levi, G., 1919, Ricerche Istologiche sul alcuni tessuti in istato di sopravivenza in vitro. Bollet. 1—2 della Societa Med. Chir. di Pavia, p. 1—599.

18. Übung.

Seite 72—74.
Material: Blasenmuskulatur vom Kaninchen.
Nährlösungen und Waschflüssigkeiten: Homogenes Plasma und Serum, Ringerlösung.
Einschlägige Arbeiten: Champy, C., 1913, Notes de biologie cytologique. Généralités I, Le muscle lisse II. Arch. de zool. exp. et gén., Bd. 42, S. 53.

19. und 20. Übung.

Seite 74—77.
Material: Hühnerembryonen von 10—13 Tagen oder Meerschweinembryonen.
Nährlösungen und Waschflüssigkeiten: Homogenes Plasma und Embryonal-Extrakt des betreffenden Tieres. Ringerlösung.
Einschlägige Arbeiten: Fischer, A., 1922, A three months old strain of epitelium. Journ. of exp. Med., Bd. 24, S. 367—373.

21. Übung.

Seite 77—79.
Material: Schilddrüse eines jungen Kaninchens.
Nährlösungen und Waschflüssigkeiten: Homogenes Plasma und Serum. Ringerlösung.
Einschlägige Arbeiten: Champy, C., 1915, Quelques resultats de la methode des cultures des tissues. V. La glande thyroide. Arch. de Zool. Exp. et Général, Bd. 55, S. 16—79.

22. Übung.

Seite 79—80.
Material: Prostata des Meerschweinchens, Samenblasenflüssigkeit des Meerschweinchens.
Nährlösungen und Waschflüssigkeiten: Plasma, Serum, Ringerlösung.
Einschlägige Arbeiten: Champy, C., 1919, Perte de la sécrétion spécifique des cellules cultivées in vitro. Compt. rend. Soc. Biol., Bd. 83, S. 842.

23. Übung.

Seite 80—82.

Material: Puppen eines größeren Schmetterlings, am besten Samia cecrobia.

Nährlösungen und Waschflüssigkeiten: Clark- und Vernonssche Lösung nach Vorschrift, siehe S. 81, Ringerlösung.

Einschlägige Arbeiten: GOLDSCHMIDT, R., 1917, Versuche zur Spermatogenese in vitro. Arch. f. Zellforschung, Bd. 14, S. 421—450.

24. Übung.

Seite 83—84.

Material: a) Hühnerembryo, ca. 15 Tage alt, Haut, Milz, Niere, Schilddrüse, Hoden; b) erwachsenes Kaninchen, Unterhautbindegewebe, Milz, Niere, Schilddrüse, Hoden.

Nährmedien und Waschflüssigkeiten: Hühner- und Kaninchenplasma, Hühner- und Kaninchenserum, Ringerlösung.

Einschlägige Arbeiten: CHAMPY, C., 1913, La dédifférenciation des tissues cultivés en dehors de l'organisme. Bibl. anat., Bd. 23.

25. Übung.

Seite 84—88.

Material: Erwachsener Frosch, Hühnerembryo.

Nährmedien und Waschflüssigkeiten: Froschplasma, Hühnerplasma, Augenkammerwasser des Frosches, Locke-Lewis-Lösung, Ringerlösung.

Einschlägige Arbeiten: UHLENHUTH, E., 1916, Changes in Pigment Epithelium Cells and Iris Pigment Cells of Rana Pipiens. Induced by Changes in Environmental Conditions. Journ. of exp. Med., Bd. 24, S. 689—699. — SMITH, DAVID T., 1920, The Pigmented epithelium of the Embryo Chicks Eye studied in vivo and in vitro. The Johns Hopkins Hosp., Bull., Bd. 31, Nr. 353, S. 239—246. — LUNA, E., 1917, Note citologica sull epitelio pigmentate della retina cultivate in vitro. Arch. Ital. d'Anat. ed di Embr. XV. — CHAMPY, C., 1914, Quelques resultats de la methode de culture des tissues. III. La rétine. Arch. de Zool. Expér. et Générale, Bd. 53, S. 5.

26. Übung.

Seite 89—96.

Material: Froschlarve, Hühnerembryo, eben geborene Katze oder Meerschwein.

Nährmedien und Waschflüssigkeiten: Plasma und Serum des betreffenden Tieres, Ringerlösung.

Einschlägige Arbeiten: HARRISOH, R. G., 1906/07, Observations on the living developing nerve fiber. Proc. soc. exp. Biol. and Med., Bd. 4, S. 140. — HARRISON, R. G., 1910, The development of peripheral nerve fibers in altered surroundings. Arch. f. Entw.-Mech., Bd. 30, S. 15—33. — HARRISON, R. G., 1911, The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. The Journ. of exp. Zool., Bd. 9, S. 787—848. — LEVI, G., 1916, Sull'origine rete nervose nelle culture di tessuti. R. Acc. Lincei, Bd. 25, Serie 9, 1. Sem., Blatt 9. — INGEBRIGTSEN, R., 1913, Regeneration of axis cylinders in vitro. Com 1, and 2. Journ. of exp. Med., Bd. 17, S. 182, and Bd. 18, S. 412. — BRAUS, H., Die Entstehung der Nervenbahnen. Samml. wiss. Vortr. Geb. Nat. u. Med. (Vogel, Leipzig), 3. Heft. — MATSUMOTO, T., 1920, The Granules, vacuoles and mitochondria in the sympathic nerve fibers, cultivated in vitro. Bull. Johns Hopkins Hosp., S. 91—93.

27. Übung.

Seite 97—100.

Material: Ringelnatter, Ratte, Katze.

Nährmedien und Waschflüssigkeiten: Das zu jedem Tiere gehörige Plasma, Ringerlösung.

Einschlägige Arbeiten: GRAWITZ, P., 1914, Abbau und Entzündung des Herzklappengewebes, S. 1—32. Berlin, Schötz. — ERDMANN, RH., 1921, Das Verhalten der Herzklappen der Reptilien und Mammaliee in der Gewebekultur. Arch. f. Entw.-Mech., Bd. 46.

28. Übung.

Seite 100—105.

Material: Ein Tiersarkom, ein Tierkarzinom.

Nährmedien und Waschflüssigkeiten: Das zu dem betreffenden Tier gehöriger Plasma, Hühnerplasma, Drewsche Lösung, Embryonal-Extrakt vom Huhn, Ringerlösung.

Einschlägige Arbeiten: LAMBERT, R. A., 1913, Comparative studies upon cancer cells and normal cels. II. The character of growth in vitro with special reference to the cell divisions. Journ. of exp. Med. 17, Bd. 5, S. 499—510. — DREW, A. H., 1922, A comparative Study of normal and malignant tissuse, grown in artificial culture. Brit. Journ. exp. Path., Bd. 3, S. 20—29.

29. Übung.

Seite 105—106.

Material: Hühnerembryo, ein Stamm Tuberkelbazillen.

Nährmedien und Waschflüssigkeiten: Locke-Lewis-Lösung, Ringerlösung.

Einschlägige Arbeiten: LEWIS, M., 1920, The formation of vacuoles due to Bacillus typhosus in the cells of tissue of the Intestine of the Chick embryo. Journ. of exp. Med., Bd. 31, S. 293—311. — SMYTH, H. F., 1915, The reaction between Bacteria and animal tissues under condition of artificial cultivation. Journ. of exp. Med., Bd. 21, S. 103; SMYTH, H. F., 1916, The reaction between Bacteria and animal tissue under condition of artificial cultivation. The cultivation of tubercle bacilli with animal tissues in vitro. Journ. of exp. Med., Bd. 23, S. 283.

30. Übung.

Seite 106—107.

Material: Menschliche Lymphknoten.

Nährmedien und Waschflüssigkeiten: Menschenplasma, Hühnerplasma, Ringerlösung.

Einschlägige Arbeiten: LEWIS, W. H., and WEBSTER, L. T., 1921, Giant cells in cultures from human lymph nodes. Journ. exp. Med., vol. 33. — LEWIS, W. H., and WEBSTER, L. T., 1921, Migration of lymphocytes in plasma cultures of human lymph nodes. Journ. of exp. Med., vol. 33, Nr. 2, pp. 261—270.

31. Übung.

Seite 108—109.

Material: Hühnerembryo.

Nährmedien und Waschflüssigkeiten: Kaninchenplasma, Hühnerplasma, Ringerlösung.

Einschlägige Arbeiten: HADDA, S. und ROSENTHAL, F., 1913, Studien über den Einfluß der Hämolysine auf die Kultur lebender Gewebe außerhalb des Organismus. Zeitschrift für Immunitätsforschung u. exp. Therapie, Bd. 16, S. 524—548.





Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig